

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

---

**STUDIUM BIODEGRADACE PCB  
POMOCÍ LIGNINOLYTICKÝCH HUB**

**STUDY ON BIODEGRADATION OF PCBs  
BY WHITE-ROT FUNGI**

Diplomová práce  
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Bc. Lenka Kožená

Diplomová práce byla vypracována na AV v ČR v Praze na Sektoru ekologie Mikrobiologického ústavu v Laboratoři environmentální biotechnologie v letech 2008 - 2010. Tato práce byla financována z grantu č. 2B06156 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a z ústavního výzkumného záměru č. AV0Z0200510.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Studium biodegradace PCB pomocí ligninolytických hub“ vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Tomáše Cajthamla, PhD. a garantky práce Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....

Bc. Lenka Kožená

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji školiteli RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, PhD. za čas, který mi věnoval, za odborné vedení diplomové práce a za poskytnuté připomínky. Děkuji Mgr. Kateřině Svobodové, PhD. za pomoc při práci v laboratoři a při zpracování výsledků. Děkuji všem svým spolupracovníkům, kteří svými radami přispěli k usnadnění mé práce. Také děkuji všem blízkým a přátelům za podporu při psaní diplomové práce.

.....

Bc. Lenka Kožená

## ABSTRAKT

Byla sledována schopnost biodegradace komerční směsi Deloru 103 pomocí osmi druhů ligninolitických hub ve dvou typech živných médií: v dusíkem limitovaném minerálním médiu tzv. Kirkovo médium a v komplexním Malt-extrakt glukosovém médiu. Nejúčinnější biodegradace byla prokázána u kmene *Pleurotus ostreatus*, kde byla pozorována 99% biodegradace sumy kongenerů PCB po 42 dnech v obou médiích. U houby *Bjerkandera adusta* v komplexním médiu byla schopnost biodegradace 89% sumy kongenerů PCB během 42 dní. U houby *Irpex lacteus* v Kirkově médiu byla schopnost biodegradace 70% sumy kongenerů PCB během 42 dní. U ostatních studovaných ligninolytických hub byla prokázána nižší schopnost biodegradace, zejména pak byly degradovány nízkochlorované bifenyly. Dále byla sledována akutní toxicita v průběhu biodegradace Deloru 103. Nejvhodnější pro dekontaminaci PCB je *P. ostreatus*, neboť v průběhu biodegradace PCB bylo pozorováno snížení toxicity ve srovnání s kontrolou. U ostatních hub nebylo pozorováno snížení akutní toxicity. Také byla studována aktivita ligninolytických enzymů při biodegradaci PCB. V obou typech médií byla detekována enzymová aktivita lakasy v kulturách *Dichomitus squalens*, *Pycnoporus cinnabarinus* a *Trametes versicolor*; enzymová aktivita ligninperoxidasy v kulturách *Pycnoporus cinnabarinus*; enzymová aktivita mangan-dependentní peroxidasy v kulturách *B. adusta*, *I. lacteus* a *Phanerochaete magnoliae* (pouze v Kirkově médiu); mangan-independentní peroxidasa nebyla detekována. Z těchto výsledků naměřených v této práci nemůže být charakterizována přesná role ligninolytických enzymů při biodegradaci PCB.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Biodegradace; GC/MS; Houby bílé hniloby; Ligninolytické enzymy; Polychlorované bifenyly

## ABSTRACT

The biodegradation of Delor 103, a commercial mixture of PCB congeners, was studied with eight strains of white rot fungi in two nutritive media: in mineral nitrogen limited medium (so called Kirk medium) and in complex Malt-extract glucose medium. The most efficient biodegradation was observed with the fungus *Pleurotus ostreatus*, where 99% of PCB congener sum was degraded after 42 days in both media. *Bjerkandera adusta* was able to degrade 89% of PCB congener sum within 42 days in complex medium. *Irpex lacteus* removed 70% of PCB congener sum within 42 days in Kirk medium. Other white rot fungi showed lower biodegradation ability, degrading only low chlorinated biphenyls. Further, urgent toxicity of samples was monitored during the Delor 103 biodegradation. *P. ostreatus* proved to be the most suitable agents for PCB decontamination as a significant reduction of toxicity in comparison with controls was observed during the PCB degradation. In case of other fungi, no reduction of urgent toxicity was observed showing a disadvantage of their use for PCB biodegradation. Activities of ligninolytic enzymes during biodegradation were also studied. In both media laccase activity was detected in *Dichomitus squalens*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Trametes versicolor* cultures. Ligninperoxidase enzyme activity was detected in *Pycnoporus cinnabarinus* cultures and mangan-dependent peroxidase enzyme activity in cultures of *B. adusta*, *I. lacteus* and *Phanerochaete magnoliae* (only in Kirk medium). No mangan-independent peroxidase activity was detected in fungal cultures. Based on these results, the real role of ligninolytic enzymes in PCB elimination could not be defined.

## KEYWORDS

Biodegradation; GC/MS; Ligninolytic enzymes; Polychlorinated biphenyls; White-rot fungus

## SEZNAM ZKRATEK

2,6-DMP	2,6-dimethoxy fenol
AAO	Arylalkohol oxidasa
ABTS	2,2-azinodi-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonát
CB	Chlorbifenyl
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DMSO	Dimethyl sulfoxid
ECD	Detektor elektronového záchytu
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
$f_k$	Korekční faktor po expozici 15 min
$f_p$	Předběžný korekční faktor po expozici 15 min
GC	Plynová chromatografie
HK	Abiotická kontrola
HN	Médium bohaté na dusík
HOPDA	2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienová kyselina
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií
$I_i$	Inhibice luminiscence po čase $t$ [%]
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
KIRK	Kirkovo médium (dusíkem limitované minerální médium)
Lac	Lakasa
$L_{i0}$	Intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií na počátku [V]
LiP	Ligninperoxidasa
$L_{it}$	Intenzita luminiscence ve vzorku po čase $t$ [V]

L <sub>kt</sub>	Intenzita luminiscence netoxické kontroly po expozici v čase t [V]
LN	Dusíkem limitované médium
LOQ	Kvantifikační limit
L <sub>p</sub>	Intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií po čase t [V]
MEG	Malt-extrakt glukózové médium (komplexní médium)
MiP	Mangan-independentní peroxidasa
MnP	Mangan-dependentní peroxidasa
MS	Hmotnostní spektrometrie
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenylly
POP	Perzistentní organické polutanty
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEF	Faktor toxického ekvivalentu
TIC	Celkový iontový proud
VP	Versatilní peroxidasa

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>PCB.....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Chemická struktura PCB .....	11
2.1.2	Fyzikální vlastnosti PCB .....	11
2.1.3	Tepelná a chemická stálost .....	12
2.1.4	Použití PCB a zdroje znečištění.....	12
2.1.5	Výroba PCB.....	13
2.1.6	Toxicita PCB .....	14
2.1.7	Likvidace, legislativa a inventarizace PCB v ČR .....	14
2.1.8	Dopady na zdraví organismů .....	15
<b>2.2</b>	<b>LIGNINOLYTICKÉ HOUBY .....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Ligninolytické enzymy .....	17
2.2.1.1	Lakasa .....	17
2.2.1.2	Ligninperoxidasa.....	17
2.2.1.3	Mn-dependentní peroxidasa .....	18
2.2.1.4	Versatilní peroxidasa.....	18
<b>2.3</b>	<b>BIODEGRADACE PCB.....</b>	<b>19</b>
2.3.1	Mechanismus ko-metabolismu bakteriální aerobní degradace PCB.....	20
2.3.1.1	Metabolismus degradace chlorbenzoátů .....	23
2.3.2	Aerobní růst bakterií na PCB jako jediný zdroj uhlíku a energie .....	25
2.3.3	Mechanismus bakteriální anaerobní degradace PCB.....	25
2.3.4	Aerobní ko-metabolismus PCB u ligninolytických hub .....	26
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Tekutá živá média.....	33
4.1.2	Rozpouštědla .....	34
4.1.3	PCB .....	34
4.1.4	Další chemikálie .....	34
<b>4.2</b>	<b>STUDOVANÉ LIGNINOLYTICKÉ HOUBY .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>KULTIVACE HOUBOVÝCH KULTUR .....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Příprava houbového inokula .....	36
4.3.2	Příprava houbové kultury pro degradační experimenty .....	36
<b>4.4</b>	<b>STANOVENÍ PCB .....</b>	<b>37</b>
4.4.1	Příprava vzorku - extrakce.....	37
4.4.2	Analýza PCB .....	38



<b>4.5</b>	<b>STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY .....</b>	<b>39</b>
4.5.1	Princip testu toxicity .....	39
4.5.2	Příprava bakterií .....	39
4.5.3	Příprava vzorku.....	40
4.5.4	Zjištění optimální koncentrace DMSO .....	40
4.5.5	Vlastní měření .....	40
<b>4.6</b>	<b>STANOVENÍ ENZYMATICKÝCH AKTIVIT .....</b>	<b>42</b>
4.6.1	Lakasa.....	42
4.6.2	Mn-dependentní peroxidasa.....	42
4.6.3	Ligninperoxidasa .....	43
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>BIODEGRADACE PCB LIGNINOLYTICKÝMI HOUBAMI.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>EKOTOXICITA TEKUTÝCH PŮDNÍCH VZORKŮ .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>ENZYMOVÁ AKTIVITA .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>79</b>

# 1 ÚVOD

Perzistentní organické polutanty (POP) a zejména polychlorované bifenyly (PCB) jsou aktuálním problémem životního prostředí. Tyto sloučeniny znečišťují životní prostředí a díky své lipofilitě a nízké schopnosti biotransformace se hromadí v potravním řetězci, kumulují v tukových tkání organismů a vyvolávají poškození organismu. Expozice PCB ovlivňuje mozek, srdce, imunitní systém, játra, ledviny a reprodukční systém. PCB jsou podezřelé z karcinogenity jater [1]. Cílem je efektivně likvidovat tyto toxické látky, které se do životního prostředí dostaly v důsledku rozsáhlé průmyslové aplikace PCB. Metody k odstraňování kontaminantů z prostředí jsou trojího typu: fyzikální, chemické a biologické. Jedním z možných řešení jsou biologické dekontaminační technologie, které využívají aktivity bakterií, hub a rostlin.

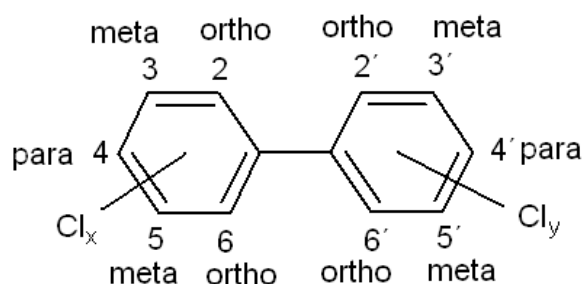
Dřevokazné ligninolytické houby jsou perspektivní organismy z hlediska bioremediací. U těchto hub byla prokázána schopnost degradace PCB pomocí ligninolytických enzymů. Biodegradace pomocí ligninolytických hub však není dosud dostatečně prozkoumána. Úkolem diplomové práce je studium biodegradačních procesů PCB v tekutých uměle kontaminovaných půdách za různých fyziologických podmínek pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub, detekce aktivit ligninolytických enzymů v průběhu degradačních experimentů a vyhodnocení změn akutní toxicity v průběhu biodegradace PCB.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 PCB

#### 2.1.1 Chemická struktura PCB

PCB jsou organické látky odvozené od bifenyly, kde jsou jednotlivé atomy vodíku substituovány atomy chloru. Sumární vzorec PCB je  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , kdy  $n = x + y$ . Číslování polohy chlorů je znázorněno na Obr. 1. Čísla 2,2',6,6' vyznačují polohu *ortho*, čísla 3,3',5,5' polohu *meta* a 4,4' polohu *para*. Jednotlivé PCB se dělí podle počtu atomů chloru na mono-, di- až deka-CB [2]. Ballschmiter a kol. (1980) [3] přiřadil pro snadnější orientaci k jednotlivým kongenerům čísla od 1 do 209, která byla oficiálně schválena Mezinárodní unií pro teoretickou a aplikovanou chemii (IUPAC), viz příloha A. Kongenery se liší fyzikálními a chemickými vlastnostmi i toxicitou. Rozdíl spočívá ve stupni chlorace a polohy atomů chloru v molekule [2].



Obr. 1 Polychlorovaný bifenyl

#### 2.1.2 Fyzikální vlastnosti PCB

Vlastnosti PCB jsou závislé na počtu atomu chloru v molekule. Méně chlorované PCB jsou kapaliny a více chlorované jsou pevné látky [4]. Komerční směsi PCB jsou ve formě olejových tekutin. Podle stupně chlorace jsou PCB bezbarvé až nažloutlé. Společnou vlastností kongenerů PCB je nízká rozpustnost ve vodě, která se pohybuje v rozmezí  $0,02 - 7 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/l}$  [5]. Rozpustnost ve vodě

klesá s rostoucím počtem atomu chlorů. Jsou dobře rozpustné ve většině nepolárních, organických rozpouštědel a v tucích. Hustota směsí závisí na stupni chlorace, s rostoucím počtem atomu chloru se hustota zvyšuje a pohybuje se v rozmezí 1,3 – 1,6 g/cm<sup>3</sup> [1], [2], [6]. Relativní molekulová hmotnost PCB se pohybuje v rozmezí 189 g/mol pro monochlorbifenyly až 489 g/mol pro dekachlorbifenyly. Bod tání je v rozmezí 34 °C až 310 °C a bod varu se pohybuje v rozmezí 260 °C až 450 °C [6].

PCB dosáhly velmi širokého uplatnění v průmyslu díky výborným vlastnostem, mezi něž patří: teplotní stálost, odolnost vůči vzplanutí při teplotách jejich varu, odolnost vůči oxidaci, odolnost vůči kyselinám a zásadám, vysoká dielektrická konstanta a velmi nízká tenze par za normální teploty [6].

### **2.1.3 Tepelná a chemická stálost**

PCB jsou látky vynikajících technických vlastností o značné tepelné a chemické stabilitě. Jsou odolné vůči kyselinám a zásadám. PCB jsou za mírných podmínek odolné vůči oxidaci. Např. až po 2 hodinovém zahřívání se 7,5% H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> v roztoku kyseliny octové se nízkochlorované bifenyly oxidovaly na odpovídající chlorované kyseliny [7]. Při kratší době zahřívání dochází k neúplné oxidaci. PCB jsou za mírných podmínek odolné vůči hydrolýze. PCB jsou stabilní při varu pod zpětným chladičem v 2% roztoku NaOH v ethanolu po dobu 15 min [7]. Nejvýznamnější reakcí je dechlorace PCB, jako první jsou dechlorovány substituenty v poloze *meta*. Rychleji probíhá dechlorace v polárních rozpouštědlech např. v methanolu než v rozpouštědlech nepolárních [7], [8].

### **2.1.4 Použití PCB a zdroje znečištění**

Podle Stockholmské úmluvy lze použití PCB rozdělit na otevřené systémy, uzavřené systémy a sekundární zdroje vstupu PCB do prostředí.

Mezi otevřené systémy můžeme zařadit použití plastifikátorů na bázi PCB, bezuhlíkový kopírovací papír, lubrifikanty, tuže, impregnační materiály, barvy, lepidla, vosky, aditiva do cementů a omítek, materiály na mazání odlévacích forem,

materiály pro odlučovače prachu, těsnící kapaliny, inhibitory hoření, imerzní oleje a pesticidy. Otevřené systémy jsou charakterizovány únikem PCB a následnou kontaminací prostředí. V letech 1970 - 73 ve většině zemí byla přijata opatření na omezení případně zrušení použití PCB v otevřených systémech.

V uzavřených systémech se PCB používaly jako chladicí kapaliny v transformátorech, dielektrické kapaliny v malých a velkých kondenzátorech, ohnivzdorné a teplotnosné antikorozi hydraulické kapaliny v důlních zařízeních a vakuových pumpách a také teplotnosná média. V současné době je známa řada úniků z těchto uzavřených systémů do prostředí, především vlivem netěsností. Problém také představují malé kondenzátory, které nejsou recyklovatelné a stávají se tak velice nebezpečným odpadem.

Další nezanedbatelné zdroje vstupu PCB do prostředí jsou sekundární, především znovu vytěkání PCB ze sedimentů velkých vodních systémů, kam se dostaly atmosférickou depozicí nebo přímými úniky do vod [9].

### **2.1.5 Výroba PCB**

PCB se začaly vyrábět ve 30. letech 20. století v USA firmou Monosanto. Dále v Japonsku firmou Kanegafuchi. V bývalém Československu byly PCB vyráběny v letech 1959 - 1984 ve východním Slovensku v Chemku Strážské, kde bylo vyrobeno více než 21 tisíc tun [9]. Odhady říkají, že celosvětová produkce těchto sloučenin v letech 1930 - 1971 je předpokládána přibližně 1,5 milionu tun [10]. Vyrobené směsi polychlorovaných bifenyly jsou komerčně označovány u nás: Delor, Deloterm, Hydeler a v zahraničí: Aroclor, Clophen, Dykanol, Fenchlor, Chlorextol, Noflamol, Phenocloc, Pyralene, Pyranol, Sovol, Terminol [1].

PCB se vyráběly chlorací bifenyly za zvýšené teploty, jako katalyzátor reakce byly používány soli železa ( $C_{12}H_{10} + n Cl_2 \rightarrow C_{12}H_{10-n}Cl_n + n HCl$ ). Poté byla reakční směs neutralizována, destilována a získaný produkt rafinován. Technologický proces různých výrobců určoval stupeň chlorace a přítomné kongenery ve směsích, které se lišily rovněž polohou substituentů. Z 209

kongenerů jich ve větším množství vznikalo jen 102 a ty tvořily komerční směsi obsahující obvykle 50 – 60 izomerů [11], [12].

### 2.1.6 Toxicita PCB

K vyjádření potencionální toxicity organopolutantů v životním prostředí se používá tzv. faktor toxického ekvivalentu (TEF). Hodnoty jsou získány vztahením molárních koncentrací 2,3,7,8,-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) o stejné biologické aktivitě. TCDD má hodnotu TEF = 1 a je považován za nejtoxičtější ze všech známých halogenovaných aromátů [8].

Nejvíce toxické kongenery jsou ty, které mají dva atomy chloru substituované v *para* poloze a alespoň dva atomy chloru v *meta* poloze. Přičemž nemají chlor v *ortho* poloze. Nejtoxičtější kongener jsou 77 (3,3',4,4'-tetra-CB), 81 (3,4,4',5-tetra-CB), 126 (3,3',4,4',5'penta-CB) a 169 (3,3',4,4',5,5'-hexa-CB) [13].

V roce 1968 v Japonsku propukla nemoc Yusho, jejíž příčinou byl rýžový olej kontaminovaný PCB, které unikaly z kondenzátorů. Symptomy onemocnění byly akné, hnědé skvrny a zhoršené vidění. Následkem tohoto onemocnění bylo postiženo 2000 lidí a 16 zemřelo [14].

### 2.1.7 Likvidace, legislativa a inventarizace PCB v ČR

Odstranění PCB je závažným problémem z hlediska životního prostředí. Při malém obsahu PCB v kontaminovaném materiálu se odpady mohou skládkovat. K likvidaci se využívá specifických postupů, které jsou založeny na fotochemické, chemické, fyzikálněchemické nebo elektrochemické dekontaminaci. Nejrozšířenější metodou likvidace v praxi je jejich spalování. Využívá se tepelného rozkladu PCB při teplotách nad 1200 °C při přebytku kyslíku. Spalování při nižších teplotách je velmi nebezpečné, protože dochází ke vzniku chlorovaných dioxinů a dibenzofuranů, které jsou značně toxičtější než PCB [1].

Současná legislativa ČR související s problematikou PCB je obsažena ve vyhlášce č. 384/2001 Sb. Ministerstva životního prostředí ze dne 17. října 2001 o nakládání s polychlorovanými bifenyly, polychlorovanými terfenyly,

monometyltetrachlordifenylnmetanem, monometyldichlordifenylnmetanem, monometyldibromdifenylnmetanem a veškerými směsmi obsahujícími kteroukoliv z těchto látek v koncentraci větší než 50 mg/kg [15].

Jedním ze základních požadavků Směrnice Rady Evropy je závazek členských států provést na svém území inventarizaci zařízení s PCB a zabezpečit ekologickou likvidaci. Česká republika stále a průběžně provádí v souladu s požadavky směrnice Rady 96/59/ES a podle zákona o odpadech č. 185/2001 Sb. inventarizaci zařízení, která obsahují nebo mohou obsahovat PCB v koncentraci vyšší než 50 mg/kg a mají objem nad 5 litrů provozní náplně. Dále je snaha inventarizovat i zařízení, která nepodléhají kritériím směrnice Rady 96/59/ES tzn. mají vyšší koncentraci PCB než 50 mg/kg, ale objem provozní náplně je pod 5 litrů. Inventarizovaná zařízení s PCB mají být podle zákona o odpadech v nejkratší možné době dekontaminována, nejpozději však do konce roku 2010. S výjimkou transformátorů (provozní kapalina obsahuje 50 – 500 mg/kg PCB), které mohou vlastníci popřípadě provozovatelé odstranit až na konci jejich životnosti [16].

#### **2.1.8 Dopady na zdraví organismů**

PCB do organismu vstupují především orálně, dále transdermálně i inhalačně a dostávají se lymfatickým (mízním) a krevním oběhem do lymfatických uzlin, sleziny a poté se koncentrují v játrech, v tukových tkání a v mateřském mléce [17]. Sledování obsahu PCB v potravinách je proto nezbytné a touto problematikou se řadu let zabývá Česká zemědělská a potravinářská inspekce. Až do začátku 90. let bylo v ČR hlavním příjmem PCB hovězí maso a mléko. Razantní opatření přijatá v následujících letech však vedla k rychlému poklesu průměrných hladin PCB na úroveň běžnou v sousedních zemích [18]. Chronická expozice PCB ovlivňuje mozek, oči, srdce, imunitní systém, játra, ledviny, reprodukční systém a štítnou žlázu. Expozice těhotných žen může způsobovat snížení porodní váhy a neurologické poruchy dětí. Chronické inhalační expozice ovlivňují dýchací ústrojí (kašel), trávicí trakt (ztráty hmotnosti, zvracení, bolesti břicha), játra, kůže (chlorakné, vyrážky) a oči. Expozice PCB může

způsobovat rakovinu jater, konečníku, zažívacího ústrojí, lymfatické a krevní tkáň. Akutní expozice způsobují poškození kůže, křeče, poruchy sluchu a zraku [1].

## 2.2 LIGNINOLYTICKÉ HOUBY

Ligninolytické houby, rovněž označované jako „houby bílé hniloby“ způsobují tzv. bílou hnilobu dřeva. Příslušníci této skupiny jsou zejména basidiomycety a askomycety, které jsou schopné depolymerizovat a mineralizovat lignin [19].

Lignin je spolu s celulosou a hemicelulosou významnou součástí dřeva. Lignin je vysokomolekulární heterogenní polyfenolická amorfnní látka tvořena třemi základními monomery *p*-kumaryl alkohol, koniferyl alkohol a sinapyl alkohol. Tyto prekursory jsou vázány do trojrozměrných struktur etherovými vazbami nebo vazbami mezi dvěma uhlíky jejich aromatických jader [20].

Oxidace ligninu pomocí ligninolytických enzymů nepřináší houbám bílé hniloby energetický zisk, takže lignin nemůže být substrátem primárního metabolismu. Lignin je degradován kometabolicky, kdy tento proces zpřístupňuje dřevní polysacharidy z lignin-sacharidových komplexů, které poté slouží jako zdroj energie [19], [21].

Heterogenní struktura molekuly ligninu vyžaduje pro svou degradaci velmi nízkou substrátovou specifitu ligninolytických enzymů. Substrátově nespecifické ligninolytické enzymy dodávají houbám široký biodegradační potenciál [22]. Ligninolytické enzymy hub bílé hniloby degradují toxické organopolutanty např. PCB, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), dioxiny, chlorfenoly, chlorbenzeny, nitroaromáty, chlorované pesticidy, syntetická barviva, atd., které představují kontaminanty v různých složkách životního prostředí [19].



## **2.2.1 Ligninolytické enzymy**

Ligninolytické houby vylučují jeden, nebo více ligninolytických enzymů. Hlavní ligninolytické enzymy hub bílé hniloby jsou ligninperoxidasa (E.C. 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasa (E.C. 1.11.1.13), lakasa (E.C. 1.10.3.2) a versatilní peroxidasa (E.C. 1.11.1.16) [19].

### **2.2.1.1 Lakasa**

Lakasa (Lac) se u hub účastní nejen degradace ligninu, ale i u procesů jako je pigmentace, patogenita, diferenciace a tvorba plodnic hub [23]. Lac je rovněž enzym s nízkou substrátovou specifitou, molekulovou hmotností 60 - 70 kDa a různým pH optimem pro oxidaci substrátů v rozmezí 3,0 – 5,7 [23]. Lac patří k měď obsahujícím fenoloxidasám, které katalyzují čtyřelektronovou redukci kyslíku na vodu. Lac ligninolytických hub obsahuje ve své molekule čtyři atomy mědi (všechny v 2+ oxidačním stavu), které jsou distribuovány mezi třemi odlišnými vazebnými místy. Tyto měďnaté ionty hrají důležitou roli v katalytickém mechanismu enzymu, přenášejí elektrony ze substrátu na molekulu kyslíku [24].

Lac oxiduje různé sloučeniny např. fenoly, polyfenoly, aromatické aminy a nefenolické organické substráty za vzniku reaktivních radikálů, které podléhají další již neenzymatické depolymerizaci, repolymerizaci nebo demethylaci [25].

### **2.2.1.2 Ligninperoxidasa**

Ligninperoxidasa (LiP) je glykoprotein obsahující hem s molekulovou hmotností 40 - 45 kDa a nízkým pH optimem v rozmezí 2,2 - 3,0. V přítomnosti endogenně vytvářeného peroxidu vodíku LiP katalyzuje oxidaci nefenolických aromatických struktur v ligninu za vzniku aryl kationtových radikálů [26].

LiP je oxidována peroxidem vodíku, dochází k odstranění dvou elektronů z její molekuly a vzniká meziprodukt (sloučenina I) [27]. Sloučenina I oxiduje substrát odstraněním jednoho elektronu za vzniku redukovánějšího enzymového meziproduktu (sloučenina II). Tento meziprodukt poté oxiduje další molekulu substrátu jedním elektronem, čímž se enzym vrací do svého původního stavu.

Avšak druhý meziprodukt je silně reaktivní s peroxidem vodíku, proto v prostředí s nadbytkem peroxidu vodíku konvertuje na inaktivní formu enzymu (sloučenina III) [27].

#### **2.2.1.3 *Mn-dependentní peroxidasa***

Mn-dependentní peroxidasa (MnP) je také extracelulární enzym obsahující hem. Katalyzuje  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependentní oxidaci  $\text{Mn}^{2+}$  na silně reaktivní  $\text{Mn}^{3+}$ , který je stabilizován cheláty (např. s kyselinou šťavelovou). Poté kation  $\text{Mn}^{3+}$  oxiduje fenolické kruhy substrátů, což má za následek tvorbu volných fenolických radikálů, což vede dále k rozpadu těchto sloučenin [22]. MnP je stejně jako LiP produkována v mnoha izoformách průměrné molekulové hmotnosti 45 - 55 kDa [20]. Tyto isoformy mají odlišné izoelektrické body, které se nacházejí u většiny enzymů v kyselé oblasti ( $\text{pH} = 3 - 4$ ) [22].

Katalytické cykly hemových peroxidas LiP a MnP jsou podobné. Katalytický cyklus MnP zahrnuje nativní formu enzymu obsahující v hemu kation  $\text{Fe}^{3+}$  a reaktivní meziprodukty (sloučenina I, sloučenina II) [28]. Transfer dvou elektronů z hemu má za následek formování prvního meziproduktu (sloučeniny I) a odštěpení molekuly vody. Dále účinkem jednoho elektronu, který je uvolněn při oxidaci iontu  $\text{Mn}^{2+}$ , vzniká druhý meziprodukt (sloučenina II). Oxidací druhého iontu  $\text{Mn}^{2+}$  se enzym vrací do svého nativního stavu.  $\text{Mn}^{3+}$  poté oxiduje fenolické kruhy na fenoxylóvé radikály. Reaktivní  $\text{Mn}^{3+}$  je stabilizován během cyklu karboxylovými kyselinami (šťavelová, malonová, mléčná). Vzniklé cheláty mohou následně katalyzovat jedno-elektronovou oxidaci různých substrátů [28].

U některých hub existují ještě peroxidasy, které obdobně jako MnP oxidují fenolické i nefenolické aromatické substráty, avšak v Mn-independentních reakcích. Tyto enzymy jsou často nazývány versatilní peroxidasy a lze na ně pohlížet jako na hybridní formy LiP a MnP [19].

#### **2.2.1.4 *Versatilní peroxidasa***

Versatilní peroxidasa (VP) byla jako ligninolytický enzym poprvé popsána u houby *Pleurotus eryngii* [29]. Později byla přítomnost VP prokázána také

u dalších druhů hub rodů *Pleurotus* a *Bjerkandera*. VP je schopna katalyzovat jak redoxní reakce typické pro LiP, tj. oxidaci nefenolických aromatických substrátů za vzniku aromatických radikálů, tak reakce typické pro MnP, tj. oxidaci  $\text{Mn}^{2+}$  na  $\text{Mn}^{3+}$ . Katalytické vlastnosti VP vedly k označení tohoto enzymu jako LiP-MnP hybrid. Hybridní vlastnosti VP byly potvrzeny analýzou trojrozměrného modelu enzymu, na kterém byly nalezeny jak struktury přítomné u MnP, tak u LiP [30]. VP z *P. eryngii* má vyšší afinitu k  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{Mn}^{2+}$  než jiné peroxidasy. Navíc také dobře oxiduje některé substituované fenoly, jež zmíněné peroxidasy neoxidují [30]. Produkce VP byla studována u malého množství ligninolytických hub. Dosud chybí též detailnější informace o biodegradačním potenciálu tohoto enzymu.

## 2.3 BIODEGRADACE PCB

Xenobiotika, mezi která patří polycyklické aromatické uhlovodíky, PCB, dioxiny apod. jsou v současné době velkým problémem životního prostředí. Jejich přirozený rozklad půdní mikrobiotou probíhá pomalu a někdy končí pouze hydroxylací původní sloučeniny. Jednou z možných metod odstranění polutantů z životního prostředí je využití schopnosti biodegradace. Bioremediace je biotechnologický proces využívající biodegradační potenciál bakterií, hub, případně vyšších rostlin pro rozklad a detoxikaci xenobiotik obsažených v půdě a ve vodě. Účinnost biodegradace perzistentních organopolutantů závisí na biodegradační kapacitě použitého organismu. Podmínky prostředí musí být přizpůsobeny použitému organismu, aby mohl růst a být aktivní [29], [32].

Velmi dobře je prostudována degradační dráha PCB u bakterií, které je umějí i mineralizovat [33]. Mechanismus bakteriální degradace PCB je předmětem aerobního a anaerobního metabolismu. Za aerobních podmínek mohou být méněchlorované bifenyly ko-metabolizovány za vzniku chlorbenzoových a 5-C chloralifatických kyselin [33]. Za anaerobních podmínek vícesubstituované chlorbifenyly podléhají reduktivní dechloraci v polohách *meta* a *para*, tím dochází ke snižování toxicity a ke kumulaci *orto*- chlorovaných mono-, di- a tri-chlorbifenyly, za předpokladu přítomnosti substrátu - donoru elektronů [33].

V porovnání s bakteriemi nejsou schopné rostliny degradovat bifenylový kruh PCB, ale přeměňují PCB na hydroxychlorbifenyly [34].

Mechanismus biodegradace PCB pomocí ligninolytických hub není zcela objasněn [35].

### 2.3.1 Mechanismus ko-metabolismu bakteriální aerobní degradace PCB

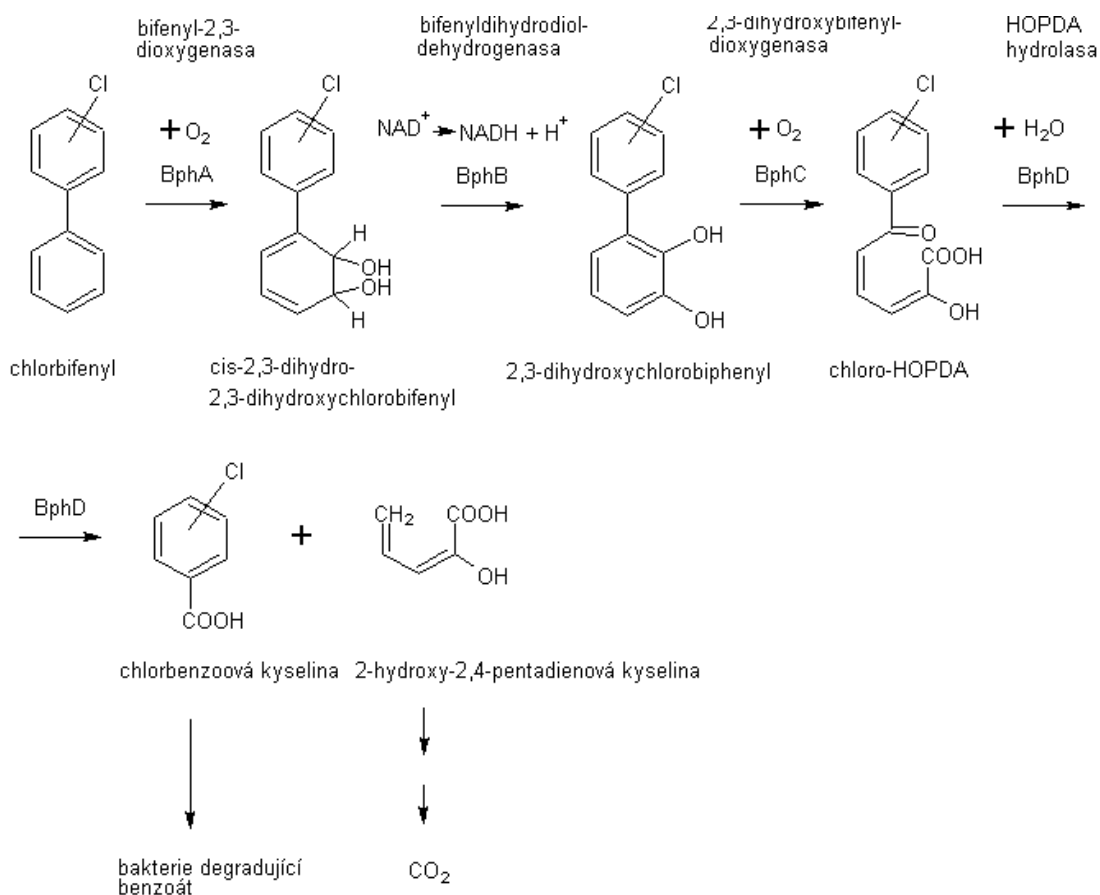
Velký počet aerobních bakterií má schopnost metabolizovat PCB a využívají bifenylyl jako primární substrát (zdroj energie a uhlíku) [33]. PCB-degradující bakterie patří mezi gram-negativní rody *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Sphingomonas*, *Ralstonia* a *Acinetobacter* a mezi gram-pozitivní rody *Rhodococcus*, *Corynebacterium* a *Bacillus*. Za degradaci PCB u těchto bakterií jsou zodpovědné bifenylyl metabolické enzymy, které jsou kódovány *bph* geny [33]. Bifenylový operon (*bph*ABCD) je lokalizován na chromozomu a kóduje sadu čtyř enzymů podílejících se na degradaci PCB na chlorbenzoáty a 5-C chloralifatické kyseliny [36].

V rozsáhlém screenigovém programu bylo pozorováno na testovaných vzorcích kontaminované zeminy, že přítomné aerobní PCB degradující bakterie ko-metabolizují nižší chlorované kongenery PCB [33]. Téměř u všech izolátů byla prokázána schopnost degradace di-chlorbifenylylů (např. 2,3-, 2,4-' nebo 4,4'-diCB). Tento trend je odrazem obecného zjištění, že aerobní biologická rozložitelnost PCB klesá s větším počtem chloru. PCB kongenery s *ortho* substitucí jsou také obtížně degradované, pravděpodobně kvůli sterickým překážkám. Avšak bylo zjištěno, že ke ko-metabolismu u *ortho*-substituovaných kongenerů PCB dochází např. u bakteriálních kultur *Burkholderia xenovorans* LB400 a *Ralstonia eutropha* H850, které mají 3,4-bifenylyl dioxygenasy [33].

Enzym účastnící se ko-metabolismu *meta*- a *para*- substituovaných kongenerů PCB je bifenylyl-2,3-dioxygenasa, jeho specifita určuje pořadí degradovatelnosti jednotlivých kongenerů. Na základě tohoto zjištění vyvodil Furukawa pět základních principů degradace PCB, které jsou založeny na vztahu mezi strukturou kongenerů a jejich biodegradabilitou [37]. Biodegradabilita klesá se

stoupajícím stupněm chlorace. Dva atomy chloru v polohách *ortho* (2,6- nebo 2,2'-) zvyšují rezistenci k biodegradaci. Kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou obecně transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích. Tetra- a penta-chlorbifenyly jsou transformovány mnohem snadněji, když jeden z kruhů je substituován v polohách 2 a 3. Iniciační oxidace obvykle probíhá na méně substituovaném kruhu [37].

Na Obr. 2 je znázorněna metabolická aerobní dráha degradace bifenyly PCB půdními bakteriemi [33]. Aerobní degradace PCB probíhá čtyřstupňovým procesem. Tato degradace je zahájena oxidací kruhu bifenyly, který je nechlorovaný nebo méně chlorovaný v nesubstituovaných polohách 2 a 3 (nebo 5 a 6). Iniciačním enzymem celé dráhy je bifenyl-2,3-dioxygenasa. Vzniká meziprodukt 2,3-dihydro-2,3-dihydroxychlorbifenyl v konformaci *cis*, který je následně dehydrogenován bifenyldihydrogendioldehydrogenasou na 2,3-dihydroxybifenyl, který podléhá meta štěpení pomocí 2,3-dihydroxybifenyldioxygenasy na 2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienovou kyselinu (HOPDA). Alifatická část HOPDA je štěpena specifickou HOPDA hydrolasou na chlorbenzoovou kyselinu a alifatickou kyselinu 2-hydroxy-2,4-pentadienovou. Tato alifatická kyselina dále vstupuje do metabolického cyklu jako acetyl-CoA a v konečném důsledku vede její oxidace ke vzniku CO<sub>2</sub> [38], [39].



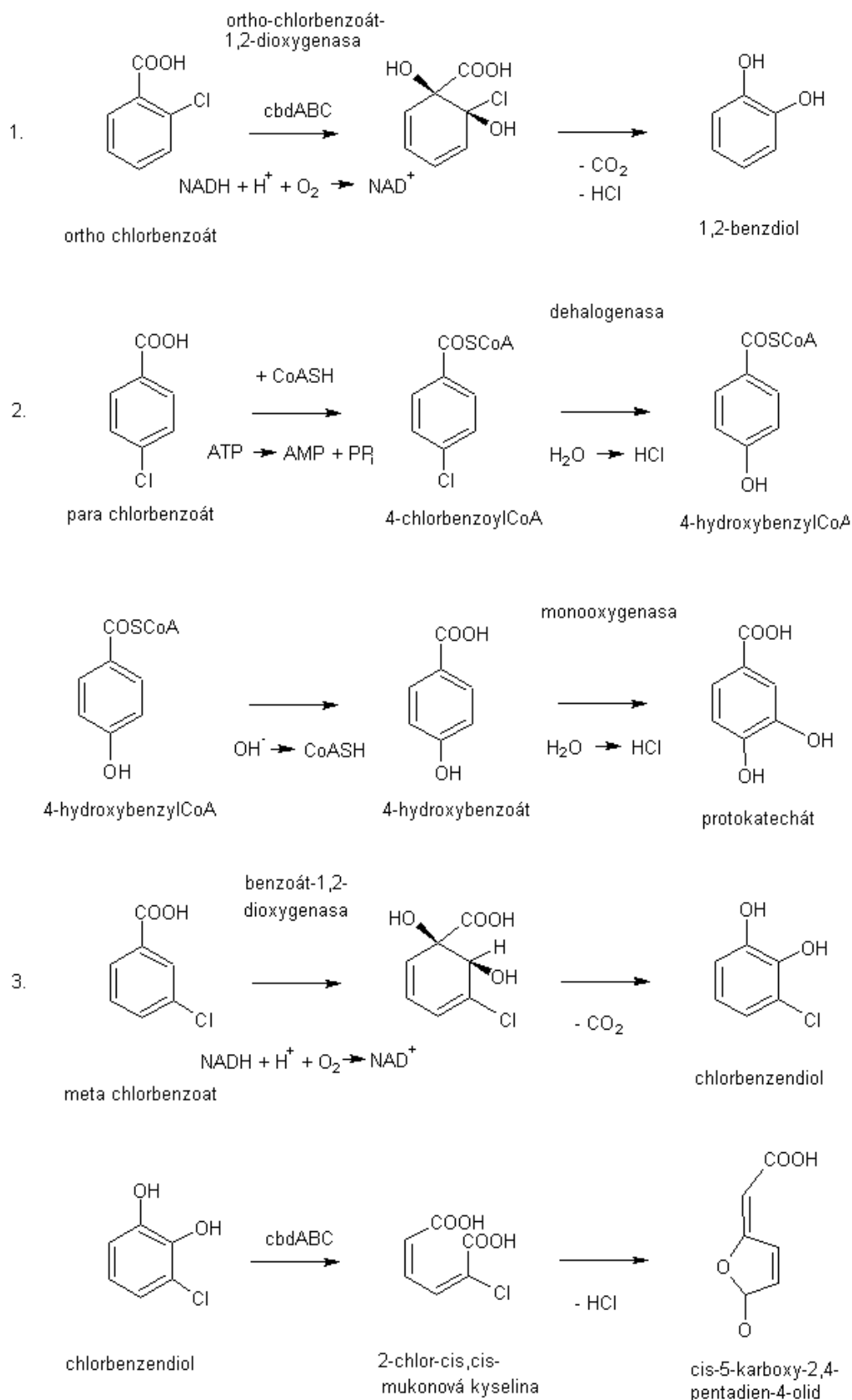
**Obr. 2 Metabolická aerobní dráha degradace bifenyly a PCB půdními bakteriemi [33]**

Enzym, který je využíván v ko-metabolismu *ortho*- substituovaných kongenerů PCB je biphenyl-3,4-dioxygenasa. Tento enzym má odlišnou specifitu než biphenyl-2,3-dioxygenasa, proto v jejím případě platí odlišné principy degradace založené na vztahu mezi strukturou kongeneru a jeho biodegradabilitou [39]. Mnoho di-*ortho*-substituovaných kongenerů (2,2'-dichlor-; 2,3,6- a 2,5,2'-trichlor- a 2,5,2',5'-tetrachlorbifenyly) a několik tri- a tetra-*ortho*-substituovaných kongenerů (2,4,6,2',5'-pentachlor-, 2,3,5,6,2',5'- a 2,3,6,2',3',6'-hexachlorbifenyly) jsou degradovány snadněji než kongenery méně chlorované se substituenty v obou polohách *para* (4,4'). Vícechlorované bifenyly substituované v polohách 2 a 3 jsou degradovány hůře než kongenery substituované v polohách 2 a 5. Kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou obecně transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích. 2,4,4'- a 2,5,4'-trichlorbifenyly jsou metabolizovány štěpením disubstituovaného jádra za vzniku produktu 4-chlorbenzoátu [39].

Mezi aerobními bakteriemi jednotliví zástupci používají pro metabolismus PCB tři dráhy. Existují tak bakterie metabolizující bifenyl na chlorbenzoáty a 5-C chloralifatické kyseliny, dále bakterie metabolizující chlorbenzoáty a bakterie dehalogenující 5-C chloralifatické kyseliny. Genetické inženýrství pomocí molekulárně-biologických metod využívá genetickou výbavu těchto tří typů bakterií s cílem sestrojit jeden organismus, který by byl schopen kompletně rozkládat PCB [36].

### **2.3.1.1 *Metabolismus degradace chlorbenzoátů***

Geny kódující enzymy zodpovědné za degradaci chlorbenzoátů jsou umístěny na chromozomu nebo na konjugovaných plasmidech. Často jsou součástí transposonů, které umožňují jejich přenos [38]. Popsány jsou tři typy aerobního metabolismu chlorbenzoových kyselin, které jsou znázorněny na Obr. 3. Prvním typem je metabolismus *ortho*-chlorbenzoových kyselin. Iniciační krok realizuje *o*-chlorbenzoát-1,2-dioxygenasa a druhý krok dehalogenační dekarboxylace probíhá spontánně za vzniku 1,2-benzendiolu. Druhým typem je hydrolytická dehalogenace *para*-chlorbenzoových kyselin. Probíhá dehalogenasou přes 4-chlorbenzoyl-CoA na 4-hydroxybenzoyl-CoA, který je hydrolyzován na 4-hydroxybenzoát, který je monooxygenasou hydroxylován na protokatechát. Třetím typem je oxidace *meta*-chlorbenzoových kyselin. Nejprve jsou benzoát-1,2-dioxygenasou oxidovány a dekarboxylovány na chlorbenzendioly, které jsou metabolizovány tzv. modifikovanou *ortho* dráhou na 2-chlor-*cis,cis*-mukonovou kyselinu spontánně cyklizující na *cis*-5-karboxy-2,4-pentadien-4-olid [40].



Obr. 3 Metabolická dráha chlorbenzoátů 1. *ortho*, 2. *para* a 3. *meta*



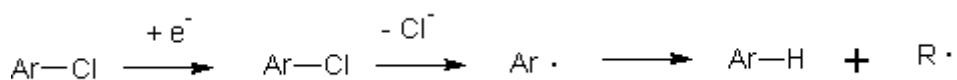
### 2.3.2 Aerobní růst bakterií na PCB jako jediný zdroj uhlíku a energie

Některé bakterie mají schopnost růst na mono- a di-chlorbifenyloch, které slouží jako zdroj uhlíku a energie. Příklady růstu na 4-chlorbifenyly (4-CB) jsou běžné, zatímco, příklady na 2-CB a 3-CB jsou méně časté. Např. *Burkholderia cepacia* využívá 4-CB, 2-CB a 3-CB jako růstové substráty [41]. Nicméně, je růst na 2-CB a 3-CB omezen v důsledku hromadění toxických meziproductů. Neomezený růst na 4-CB vyplývá ze schopnosti kmenů snadno mineralizovat 4-chlorobenzoovou kyselinu bez vzniku jakýchkoli toxických meziproductů [33].

### 2.3.3 Mechanismus bakteriální anaerobní degradace PCB

Vzhledem k tomu, že aerobní biologická rozložitelnost PCB je značně limitována vzrůstajícím stupněm chlorace, je redukční dechlorace vysokochlorovaných bifenyly na nízkochlorované významným stupněm biotransformace těchto polutantů [42].

Redukční dehalogenace je dvoustupňový proces, který probíhá za předpokladu přítomnosti donoru elektronů tj. redukčního činidla. Z molekuly bifenyly je odštěpen atom chloru ve formě chloridového aniontu, který je nahrazen atomem vodíku, tento proces je znázorněn na Obr. 4. Struktura molekuly bifenyly zůstává zachována [43]. Limitujícím faktorem dehalogenace může být přítomnost jiných akceptorů elektronů, které přijímají elektrony, jež jsou potřebné pro redukční dehalogenaci. Nejčastěji popsány inhibitory jsou kyslík, dusičnany a sírany. Dalším významným faktorem ovlivňujícím bakteriální dehalogenaci je teplota a přítomnost živin [44].



Obr. 4 Mechanismus redukční dehalogenace

Výzkum zkoumající schopnost anaerobních bakterií degradovat technické směsi Aroclor 1242, 1248, 1254 a 1260 prokázal, že anaerobní bakterie reduktivně dechlorují vícesubstrátové kongenery v polohách *meta* a *para*, méně v poloze *ortho*,

což má za následek hromadění *ortho*-chlorovaných nižších kongenerů PCB [45]. Ztráta *meta*- a *para*- chlorovaných bifenyly je výhodná, protože kongenery s těmito polohami chloru vykazují vyšší toxicitu [46].

#### 2.3.4 Aerobní ko-metabolismus PCB u ligninolytických hub

PCB mohou být metabolizovány i houbami bílé hniloby, které jsou již dlouhou dobu považovány jako efektivní biodegradační nástroje různých organopolutantů [47]. K dispozici je několik prací o biodegradaci PCB pomocí ligninolytických hub, ale o metabolitech vznikajících v průběhu biodegradace PCB jsou k dispozici pouze práce autorů Kamei a kol. [35], [53]. Biodegradační mechanismus u hub bílé hniloby není doposud plně objasněn.

Yadav a kol. (1995) testovali schopnost biodegradace PCB směsí Aroclor 1242, 1254 a 1260 v tekutých médiích pomocí *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. Byly použity tři typy kultivačních médií: 1. dusíkem limitované médium (LN, obsahující 2,4 mM N a 56 mM glukosu), 2. na dusík bohaté médium (HN, obsahující 24 mM N a 56 mM glukosu) a 3. malt-extrakt glukózové médium (MEG, 8 mM N a 122 mM glukosa). Biodegradační experiment byl prováděn s přidavkem směsi Aroclor s výslednou teoretickou koncentrací 10 µg/ml, následovala inkubace při 37 °C po dobu 15 a 30 dnů. Po ukončení kultivace následovala homogenizace a extrakce (n-hexan/aceton v poměru 7 : 3). Analýzy PCB byly provedeny pomocí plynové chromatografie (GC) ve spojení s detektorem elektronového záchytu (ECD). Byla sledována degradace analyzovaných kongenerů PCB ve směších Aroclor v příslušných médiích, viz Tab. 1. Degradace PCB klesala s rostoucím počtem substituovaných chlorů na jádře bifenyly. Degradace většiny kongenerů ve směsi Aroclor 1242 a 1260 byla stejně intenzivní jak v dusíkem limitovaném médiu, tak v dusíkem bohatém médiu. Nejvýraznější degradace byla pozorována v malt-extrakt médiu [48].

**Tab. 1 Degradace PCB v procentech ve směších Aroclor v jednotlivých typech médií [48]**

směs	obsah Cl <sup>-</sup> [%]	LN [%]	HN [%]	MEG [%]
Aroclor 1242	42	56,3	60,9	59,2
Aroclor 1254	54	21,6	10	30,5
Aroclor 1260	60	10,7	8,4	17,6

Beaudette a kol. (1998) porovnali mineralizační experiment s výsledky degradací vybraných kongenerů PCB pomocí vybraných zástupců hub bílé hniloby. Biodegradační experiment byl prováděn v tekutém dusíkem limitovaném minerálním médiu s houbovou kulturou a kontaminovaným kongenerovou směsí PCB (kongenery 5, 15, 31, 47, 52 a 153) s výslednou teoretickou koncentrací 10 µg/ml. Analýzy PCB byly provedeny pomocí GC/ECD po 0., 7. a 21. dnu kultivace v n-hexanových extraktech kultur. Mineralizační experiment byl prováděn monitorováním rozkladu [<sup>14</sup>C] PCB 31. Dusíkem limitované minerální médium s houbovou kulturou bylo kontaminováno 100 µg kongeneru 31 a 1 µg [<sup>14</sup>C] PCB 31, který byl rozpuštěn ve 40 µl acetonu. Baňky byly po 4 denních intervalech provzdušňovány a uvolněný <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> byl absorbován a poté byla měřena jeho radioaktivita. Dále byla měřena enzymová aktivita LiP a MnP v supernatantu kultur. Výsledky biodegradace, mineralizace a enzymové aktivity jsou zaznamenány v následující Tab. 2. Oba použité kmeny *Bjerkandera adusta* ve srovnání s ostatními použitými ligninolýtickými houbami vykazovaly největší schopnost degradace kongenerů a vysokou mineralizaci. V kulturách byla naměřena enzymová aktivita LiP a MnP (s výjimkou Lip u *B. adusta* UAMH 7308). *Pleurotus ostreatus* byl také schopen jak degradace (degradoval již po 7 dnech), tak mineralizace a v kulturách byla prokázána aktivita LiP a MnP. Nejnižší schopnost biodegradace a mineralizace byla naměřena u *P. chrysosporium* a u této houby nebyla detekována aktivita MnP, ačkoliv byla očekávána. *Trametes vesicolor* nejlépe degradoval kongener 5. Tato houba vykazovala nejvyšší mineralizaci 11 %, ale degradace kongeneru 31 byla jen 40 % [49].

**Tab. 2 Biodegradace kongeneru 5 a 31, mineralizace [<sup>14</sup>C] PCB 31 a enzymová aktivita LiP a MnP pomocí použitých ligninolytických hub měřena po 21 denní inkubaci [49]**

Ligninolytická houba		Biodegradace (%)		Mineralizace PCB 31[ <sup>14</sup> C] (%)	Enzymová aktivita (U/l)	
		Kongenery <sup>1</sup>			Lip	MnP
		5	31			
<i>B. adusta</i>	UAMH 8258	87	57	6,7	0,03	1,2
<i>B. adusta</i>	UAMH 7308	93	80	4,8	ND <sup>2</sup>	7,5
<i>P. ostreatus</i>	UAMH 7964	67	51	3,9	0,15	5,0
<i>P. chrysosporium</i>	ATCC 24725	6	27	1,7	0,39	ND
<i>T. versicolor</i>	UAMH 8272	96	40	11	ND	3,9

<sup>1</sup> Číslování PCB podle IUPAC viz příloha A

<sup>2</sup> ND znamená nedetekováno (not detected)

Kubátová a kol. (2001) testovali schopnost biodegradace PCB komerční směsi Delor 103 v půdě pomocí šesti kmenů hub bílé hniloby. Biodegradační experiment byl prováděn ve speciálně navrženém reaktoru. Trubice (průměr 3,5 cm, výška 24 cm) byla rozdělena nylonovou sítí na dva oddíly. Ve spodní části byla sterilní půda kontaminovaná Delorem 103 na výslednou teoretickou koncentraci 10,2 µg/g. V horním oddílu byla sláma zaočkovaná houbou, která prorůstala slámou a dále vrůstala přes síťku do půdy. Po celou dobu dvouměsíčního experimentu byly trubice provzdušňovány a vlhčeny. Po ukončení kultivace byly půda a sláma odděleny, homogenizovány a poté následovala extrakce v Soxhletově nástavci (n-hexan/acetone v poměru 1 : 1). Analýzy PCB byly provedeny pomocí GC/ECD. Biodegradace PCB v půdě nebyla prokázána u *P. chrysosporium* a *T. versicolor*. Naopak čtyři různé kmeny *P. ostreatus* vykazovaly podobnou schopnost biodegradace, kdy došlo k odstranění 40 % Deloru 103 za dva měsíce. Kmeny *P. ostreatus* degradovaly kongenery PCB v pořadí *ortho* > *meta* > *para* a rozsah biodegradace se snižoval se stoupajícím stupněm chlorace bifenylů [50].

Moeder a kol. (2005) sledovali pak dále biodegradaci PCB v komerční směsi Delor 103 pomocí *P. ostreatus*. Biodegradační experiment byl prováděn v polypropylenových pytlích se 40 g suché slámy (75% vlhkost). Sláma byla uměle kontaminována na výslednou teoretickou koncentraci 100 µg/g slámy. Po ukončení biodegradačního experimentu následovala příprava vzorku: homogenizace, po vysušení na vzduchu extrakce toluenem (ASE, Accelerated solvent extraction). Analýzy PCB byly prováděny pomocí GC/MS. Degradace jednotlivých kongenerů byla sledována ve slámě a v plodnicích *P. ostreatus* po 44 dnech. Účinnost degradace PCB závisela kromě jiných faktorů také na fyzikálně-chemických vlastnostech, např. na rozdělovacím koeficientu oktanol-voda, molekulové hmotnosti a počtu atomů chlorů. Z fytoimediačních studií je známo, že část škodlivin přechází do rostlinné tkáně [51]. Proto se v této studii dále zabývali, zda dochází k přenosu PCB ze slámy do plodnice *P. ostreatus*. Bylo zjištěno, že do plodnice přechází méně než 1 % z celkového množství PCB ze systému sláma a mycelium [52].

Kamei a kol. (2006a) studovali degradaci 4,4'-dichlorbifenyly a jeho metabolitů pomocí *P. chrysosporium* a *Phanerochaete* sp. MZ142 v tekutém dusíkem limitovaném minerálním médiu a v dextrosovém médiu. Tekuté médium s houbovou kulturou bylo kontaminováno 4,4'-diCB v N,N-dimethylformamidu na výslednou teoretickou koncentraci 50 µg/ml. Po inkubaci byla kultura homogenizována s 20 ml acetonu, biomasa byla oddělena odstředěním a získaný supernatant byl analyzován na HPLC. *P. chrysosporium* vykazovala vyšší biodegradaci 4,4'-diCB v dusíkem limitovaném minerálním médiu. Zatímco *Phanerochaete* sp. M142 vykazovala vyšší biodegradaci v dextrosovém médiu. Dále byla provedena detekce metabolitů. Po inkubaci byla kultura homogenizována s 20 ml acetonu a biomasa byla oddělena od tekuté frakce. Zbytková biomasa byla ethylacetátem extrahována v Soxhletově extrakčním nástavci. Koncentrát byl analyzován pomocí GC/MS. *P. chrysosporium* transformovala 4,4'-diCB na metabolity 3-hydroxy-4,4'-diCB a 4-hydroxy-3,4'-diCB. *P. sp.* MZ142 transformovala 4,4'-diCB na metabolity 2-hydroxy-4,4'-diCB a 3-hydroxy-4,4'-diCB. Dále byl v kulturách *P. chrysosporium* a *Phanerochaete* sp. MZ142 3-

hydroxy-4,4'-diCB přeměňován na další metabolity: 3-methoxy-4,4'-diCB; 4-chlorbenzoovou kyselinu; 4-chlorbenzen aldehyd a 4-chlorbenzen alkohol. Bylo zjištěno, že v kultuře *Phanerochaete* sp. MZ142 nedošlo k methylaci metabolitu 2-hydroxy-4,4'-diCB. V této práci byly poprvé charakterizovány meziprodukty v PCB biodegradačním procesu pomocí hub bílé hniloby [53].

Kamei a kol. (2006b) sledovali biodegradaci PCB kongenerové směsi, která obsahovala 7 *ortho*-chlorovaných bifenyly (kongener 105, 114, 118, 123, 156, 167 a 189) a 4 *ne-ortho*-chlorovaných bifenyly (kongener 77, 81, 126 a 169) v tekutém dusíkem limitovaném minerálním médium pomocí kultur *Phanerochaete sordida*, *Phlebia acerina* a *Phlebia brevispora*. Biodegradační experiment byl prováděn v tekutém médiu s houbovou kulturou a přidavkem kongenerové směsi s výslednou teoretickou koncentrací 25  $\mu$ M. Po 28 denním biodegradačním experimentu následovala extrakce (n-hexan). Analýzy PCB byly provedeny pomocí vysokorozlišovací plynové chromatografie (HRGC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *P. sordida* nedegradovala testované kongenery PCB v tekuté půdě. Výsledky dále ukazují, že *P. acerina* byla schopna odstranit 25 % kongeneru 77. Zatímco u kmene *P. brevispora* došlo k rozkladu 50 % kongenerů 77, 105, 118 a 167 a pouze k rozkladu 25 % kongeneru 126, který patří mezi nejtoxičtější. Degradační experiment potvrdil odlišnou schopnost biodegradace jednotlivých kmenů hub bílé hniloby. Kamei a kol. se zabývali metabolity, které vznikaly v průběhu biodegradace jednotlivých kongenerů 77, 105, 118, 126 a 167 pomocí *P. acerina* a *P. brevispora*. Metabolity byly detekovány pomocí GC/MS. *P. acerina* byla schopna degradovat tetra-CB, ale metabolity nebyly prokázány. Zatímco *P. brevispora* byla schopna degradovat tetra-, penta- a hexa-CB a byl popsán vznik metabolitů methoxy-PCB, viz Tab. 3. Při metabolismu hydroxylovaných PCB a methoxy-PCB je možný vznik 3,4,5-trichlorbenzoové kyseliny (hmotnostní spektrum je blízké standardu 2,4,6-trichlorbenzoové kyseliny) [35].

**Tab. 3 Vzniklé metabolity jednotlivých kongenerů pomocí kultury *Phlebia brevispora* [35]**

Kongener a jeho číslo	metabolity
3,3',4,4'-tetraCB 77	5-methoxy-3,3',4,4'-tetraCB
2,3,3',4,4'-pentaCB 105	5-methoxy-2,3,3',4,4'-pentaCB 5-methoxy-2,3,3',4,4'-pentaCB 4-methoxy-2,3,3',4'-tetraCB
2,3',4,4',5-pentaCB 118	3-methoxy-2,3',4,4',5-pentaCB 5'-methoxy-2,3',4,4',5-pentaCB 4-methoxy-2,3',4',5-tetraCB
3,3',4,4',5 -pentaCB 126	5'-methoxy-3,3',4,4',5-pentaCB
2,3',4,4',5,5'-hexaCB 167	3-methoxy-2,3',4,4',5,5'-hexaCB 4-methoxy-2,3',4',5,5'-pentaCB

Sangely a kol. (2009) se zaměřili na studium degradovaných a adsorbovaných PCB ve vodě pomocí *P. chrysosporium*. Po biodegradačním experimentu byla použita extrakce pomocí n-hexanu a následovala analýza PCB pomocí GC/MS. Studie prokázala, že *P. chrysosporium* degradovala PCB ve vodě v rozmezí 39 - 49 % a bylo zjištěno množství adsorbovaných PCB v rozmezí 42 - 54 % [54].

### **3 CÍL PRÁCE**

Cíle diplomové práce:

1. Studium biodegradačních procesů PCB v tekutých půdách uměle kontaminovaných PCB za různých fyziologických podmínek pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub.

2. Vyhodnocení změn akutní toxicity v průběhu biodegradace PCB pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub.

3. Detekce aktivit ligninolytických enzymů v průběhu degradačních experimentů.



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

#### 4.1.1 Tekutá živá média

Komplexní Malt-extrakt glukózové médium (MEG), představuje bohaté komplexní médium, které bylo připraveno podle následujícího návodu, pH = 5,5.

##### **Malt-extrakt glukózové médium – MEG (množství v 1 l)**

Malt extrakt p.a., OXOID, USA	0,5 g
Glukosa p.a., Penta, ČR	1 g
Agar p.a., OXOID, USA	2 g
Destilovaná voda	do 1 l

Dusíkem limitované minerální médium = Kirkovo médium (KIRK) bylo připraveno ze stopových prvků, bazální směsi a základního média, pH = 4,5 [23].

##### **Stopové prvky (množství v 1 l)**

MgSO <sub>4</sub> p.a., Lachema, ČR	3,0 g
MnSO <sub>4</sub> p.a., Lachema, ČR	0,5 g
NaCl p.a., Lachema, ČR	1,0 g
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O p.a., Lachema, ČR	0,1 g
CoCl <sub>2</sub> p.a., Lachema, ČR	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O p.a., Lachema, ČR	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O p.a., Lachema, ČR	1,0 g
CaCl <sub>2</sub> p.a., Lachema, ČR	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> p.a., Lachema, ČR	10 mg
Kyselina nitrilotriglukosaethanolová p.a., Lachema, ČR	1,5 g
Destilovaná voda	do 1 l

**Bazální směs**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> p.a., Lachema, ČR	20,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O p.a., HiChem, ČR	5,0 g
CaCl <sub>2</sub> p.a., Lachema, ČR	1,0 g
Stopové prvky	100 ml

**Kirkovo médium (množství v 1 l)**

Glukosa p.a., Penta, ČR	10 g
Bazální směs	100 ml
0,1M 2,2'-dimethyl-sukcinát (DMS) 99%, Sigma Aldrich, USA	1,46 g
Thiamin p.a., Fluka, D	1,0 g
Vínan amonný p.a., Lachema, ČR	0,1 g
Stopové prvky	60 ml
Destilovaná voda	do 1 l

**4.1.2 Rozpouštědla**

Aceton p.a., Lach:ner, ČR  
Ethylacetát pro HPLC, Chromservis, ČR  
Dimethylsulfoxid pro HPLC, Chromservis, ČR

**4.1.3 PCB**

Komerční směs Delor 103 je rafinovaná směs di- až hexachorbifenilů s převahou trichlorbifenilů. Získána byla od Chemko Strážské, SR.

Standardy PCB (18, 17, 32, 16, 28+31, 33, 22, 45, 52, 49, 48+47, 44, 42, 37, 74, 70-79, 95, 66, 56+60, 101, 99+113, 110, 149, 118, 105) byly získány od AccuStandards, USA

**4.1.4 Další chemikálie**

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a., Lach:ner, ČR  
N<sub>2</sub> 99,99%, Linde, ČR

NaCl min. 99,5%, Sigma-Aldrich, USA  
dimethylsulfoxid  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, USA  
HCl 96%, Sigma-Aldrich, USA  
Kyselina ethylendiainoctová (EDTA)  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, USA  
2,6-dimetoxyfenol (DMP)  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich, USA  
Octan sodný p.a., PENTA, ČR  
2,2-azinodi-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonát (ABTS)  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, USA  
Vínan sodný p.a., Lachema, ČR  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a., Sigma-Aldrich, USA  
Veratryl aldehyd  $\geq 98\%$ , Fluka, D  
Malonát sodný p.a., Sigma-Aldrich, USA

## 4.2 STUDOVANÉ LIGNINOLYTICKÉ HOUBY

V biodegradačních studiích byly použity ligninolytické houby získané ze sbírky basidiomycet CCBAS (Culture Collection of Basidiomycetes Academy of Science, Praha). Uchování kultur probíhalo na agarových plotnách (Malt-extrakt glukozové médium) na kterých byly po 7 dní kultivovány vybranými zástupci ligninolytických hub při 28 °C a poté skladovány při 4 °C.

*Bjerkandera adusta* 606/93 (šedopórka osmahlá)

*Dichomitus squalens* CCBAS 750 (šedopórka neladná)

*Irpex lacteus* 931 (bránovitka mléčná)

*Phanerochaete chrysosporium* ME 446

*Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I

*Pleurotus ostreatus* 3004 (hlíva ústříčná)

*Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595 (outkovka rumělková)

*Trametes versicolor* 167/93 (outrovka pestrá)

## 4.3 KULTIVACE HOUBOVÝCH KULTUR

### 4.3.1 Příprava houbového inokula

Do 250 ml Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 20 ml tekutého média, uzavřeno zátkou a překryto hliníkovou fólií. Poté byla tekutá média vysterilizována v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min a při tlaku  $1,2 \cdot 10^5$  Pa (LTE Scientific, GB). Vyklávaná média byla ve sterilním boxu zaočkována vložením dvou bločků o průměru 8 mm vyříznutých z agarových ploten vybraných zástupců ligninolytických hub. Tyto prekultury byly kultivovány při teplotě 25 °C po dobu 7 dnů.

### 4.3.2 Příprava houbové kultury pro degradační experimenty

Narostlé houbové prekultury byly po 7 dnech homogenizovány pomocí homogenizátoru Ultra-Turax (IKA, Německo) ve sterilním boxu. 20 ml čerstvého tekutého média (KIRK, MEG) bylo poté zaočkováno pěti procenty tekutého inokula hub (tzn. 1 ml rozmixované houbové prekultury). Poté byly baňky kontaminovány 200 µl roztoku dimethylsulfoxidu obsahujícími 400 µg komerční směsi Delor 103. Výsledná teoretická koncentrace byla 20 µg/ml (400 µg ve 20 ml média). Byla připravena rovněž abiotická kontrola (HK) usmrcením kultury *P. ostreatus* v autoklávu a dále stejným zpracováním jako živé kultury. Biodegradace PCB pomocí ligninolytických hub byla realizována kultivací tří paralelních kultur po 28 a 42 dnů při 28°C.

## 4.4 STANOVENÍ PCB

### 4.4.1 Příprava vzorku - extrakce

1. Byl zastaven růst biomasy 28. den (1. odběr) a 42. den (2. odběr) kultivace pomocí přidavku 20 ml ethylacetátu. Erlenmayerovy baňky s myceliem a ethylacetátem byly skladovány do dalšího zpracování v lednici.

2. Homogenizace média s houbovou kulturou byla provedena pomocí mixéru Ultra-Turax (IKA, Německo) v digestoři po dobu 30 s přímo v kultivačních baňkách. Ke vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l 1M kyseliny chlorovodíkové a vzorek byl převeden do uzavíratelné 100 ml baňky s teflonovým uzávěrem. Erlenmayerova baňka byla vypláchnuta 20-ti ml ethylacetátu, který byl poté kvantitativně převeden k homogenizovanému médiu.

3. Vzorky byly extrahovány v pěti krocích vždy 10 ml ethylacetátu. Každý extrakční krok byl prováděn na třepačce 20 min. Z důvodu rozrušení emulze (rozdělení dvou fází) byl vzorek umístěn do ultrazvukové lázně na 20 min. Horní vrstva organického rozpouštědla (extrakt) byla převedena pomocí skleněné stříkačky do odpařovací baňky (srdcovky).

4. Po 5. přidavku ethylacetátu byl extrakt zkoncentrován na 2 ml na vakuové odparce RVO 400 (INGOS, ČR), parametry odparky: 100 otáček/min, 20 kPa a 40 °C.

5. Z organické fáze byla odstraněna voda pomocí sušící kolony, která byla připravena nanesením 2 g bezvodého síranu sodného do skleněné stříkačky. Na dno i vršek byl umístěn filtr ze skleněného papíru. Zakoncertovaný extrakt byl nanesen pomocí pasteurovy pipety na připravenou sušící kolonu a protlačen do označené předem zvážené 12 ml vialky. Srdcovka se zbytkem extraktu byla opakovaně (4 krát) vypláchnuta ethylacetátem a pasteurovou pipetou byl zbylý extrakt přenesen na sušící kolonu. Vialka s extraktem byla přesně zvážena a z rozdílu hmotností byl vypočten objem ethylacetátu.

5. Extrakty byly přeneseny do 2 ml krimpovacích vzorkovnic a uchovány v lednici do analýzy.

#### **4.4.2 Analýza PCB**

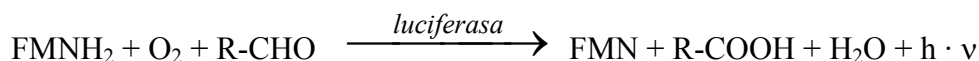
Vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu (GC) ve spojení s hmotnostním detektorem (MS). Varian 240 MS-Ion Trap (Varian, USA), spolu s Varian 450-GC (Varian, USA) byl použit pro analýzu PCB. MS detektor pracuje na principu iontové pasti. Vzorek (1 µl) byl dávkován pomocí dávkovacího zařízení CombiPAL (CTS Analytics, USA). Použitá kolona DB-5MS (Agilent, USA) měla parametry: 60 m, vnější průměr 0,25 mm a film stacionární fáze 0,25 µm. Nosným plynem bylo hélium, jehož průtok byl 1,2 ml/min. Teplota injektoru byla nastavena na 240 °C. Teplotní program byl následující: 1 min izotermálně při 60 °C při zavřeném děliči, poté byl dělič otevřen (1:50) a teplotní gradient lineárně stoupl na 120 °C s rychlostí 25 °C/min. Následoval teplotní gradient, který lineárně stoupl na 240 °C s rychlostí 2,5 °C/min, kde teplota byla konstantní po dobu 20 min. Vlastní detekce začínala po 10 min po eluci solventového píku. Zaznamenáván byl celkový iontový proud (TIC) v rozsahu 140 až 410 m/z. Jednotlivé kongenery PCB byly identifikovány pomocí srovnání se spektry a s retenčními časy příslušných chemických standardů. Koncentrace PCB byly stanovovány pomocí externích kalibračních křivek, které byly sestaveny z 5-ti bodů v koncentračním rozsahu: 0,05 - 10 µg/ml. Koncentrace PCB byly stanovovány pomocí externích kalibračních křivek, které byly sestaveny z 5-ti bodů v koncentračním rozsahu: 0,05 - 10 µg/ml.

## 4.5 STANOVENÍ AKUTNÍ TOXICITY

### 4.5.1 Princip testu toxicity

Česká technická norma pro „Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích)“ EN ISO 11348-2: (2000) popisuje stanovení inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri* (kmen: NRLL-B-11177), která je způsobena toxickými látkami rozpuštěnými ve vodě nebo ve vodném výluhu [55].

Bakteriální bioluminiscenční test toxicity používá zmražené mořské gramnegativní bakterie *Vibrio fischeri* jako testovací organismus. *Vibrio fischeri* emituje světlo, jež vzniká v organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferasou viz následující reakce na Obr. 5. Principem testu je měření redukce bioluminiscence bakterie po kontaktu mezi bakterií a vzorkem. Přírodní bioluminiscenční bakterie snižují světelnou emisi v přítomnosti toxických látek [56], [57].



Obr. 5 Chemická reakce probíhající u *Vibrio fischeri*

### 4.5.2 Příprava bakterií

Bakteriální suspenze *V. fischeri* používané pro stanovení toxicity se připravují z komerčně dostupných sušených bakterií (dodávky bakterií byly zajištěny od Ing. R. Musiala), které jsou uchovány v mrazničce při teplotě 18 °C - 20 °C. Bakterie se začínají rozmnožovat ihned po rehydrataci, která je provedena přidavkem 550 µl ledově vychlazeného 2% roztoku NaCl (20 g NaCl v 1 l H<sub>2</sub>O). Vzniklá suspenze je poté promíchána a inkubována 15 min v ledové lázni (0 °C - 2 °C). Příprava pracovní suspenze bakterií je provedena do dvou zkumavek smícháním 6 ml 2% roztoku NaCl vytemperovaného na 15 °C ± 1 °C s 200 µl

resuscitovaných bakterií. Pracovní suspenze je promíchána a vložena do vodní lázně na cca 1 hodinu, která je temperována na  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.3 Příprava vzorku

Vzorky (extrakty) jsou rozpuštěny v ethylacetátu, část objemu vzorku se odpipetuje do označené vialy a rozpouštědlo je odpařeno pod proudem dusíku. Poté je vzorek rozpuštěn pomocí DMSO na příslušnou koncentraci.

#### 4.5.4 Zjištění optimální koncentrace DMSO

Inhibice emise luminiscence kultur *V. fischeri* se stanovuje v koncentrační řadě 2, 4, 6, 8 a 10% roztoku DMSO ve 2% roztoku NaCl. Cílem je aplikovat nejvyšší možnou koncentraci roztoku DMSO ve 2% roztoku NaCl, kterou lze vyhodnotit. DMSO je toxický pro bakterie, ale zvyšuje rozpustnost toxických látek. Kritériem pro zjištění optimální koncentrace roztoku DMSO je snížení luminiscence o 20 %, měřené po 15 min.

#### 4.5.5 Vlastní měření

1. Do měřicí kyvety bylo napipetováno 500  $\mu\text{l}$  pracovní suspenze bakterií vytemperované na  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a byla změřena hodnota signálu luminiscence - napětí, [V]. Poté bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  vzorku vytemperovaného na  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vzorek byl promíchán (s kyvetou bylo manipulováno opatrně, aby se vzorek nemíchal) a byla změřena hodnota luminiscence po 15 min. Mezi inkubacemi byly vzorky odkládány do temperovaného stojánu na  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , který je součástí luminometru.

2. Byl vypočítán **předběžný korekční faktor**, podle následujícího vztahu, který by měl být v rozmezí 0,8 - 1,2.

$$f_p = \frac{L_p}{L_{io}}$$

Kde  $f_p$  - předběžný korekční faktor po expozici 15 min



$L_p$  - intenzita luminiscence prac. suspenze bakterií po expozici v čase  $t$  [V]

$L_{i0}$  - intenzita luminiscence pracovní suspenze bakterií na počátku testu [V]

3. Poté byl vypočten **korekční faktor**, který slouží ke korekci počátečních hodnot  $L_{i0}$  všech zkoušených vzorků před jejich použitím jako referenčních hodnot pro stanovení snížené luminiscence. Hodnota korekčního faktoru by měla být po 15 min 0,6 - 1,8, pokud je splněn tento rozsah, tak je zkouška platná.

$$f_{kt} = \frac{L_{kt}}{L_{i0}}$$

Kde  $f_{kt}$  - korekční faktor po expozici 15 min

$L_{kt}$  - intenzita luminiscence netoxické kontroly po expozici v čase  $t$  [V]

4. Nejprve musí být určena koncentrace sledovaných vzorků, která je vztažena ke kontrolám. Pomocí koncentrační řady bylo zjištěno vhodné ředění HK, které způsobí inhibici luminiscence v měřitelné oblasti tj. kolem 50 %. Výsledná koncentrace HK, která způsobuje inhibici v měřitelné oblasti je poté aplikována na vzorky a stejným způsobem změřena. Z naměřených hodnot inhibice bioluminiscence byl proveden výpočet inhibice pomocí následujícího vztahu.

$$I_{it} = 100 - \frac{L_{it}}{f_{kt} \cdot L_{i0}} \cdot 100$$

Kde  $I_i$  - inhibice luminiscence po čase  $t$  [%]

$L_{it}$  - intenzita luminiscence ve vzorku po čase  $t$  [V]

## 4.6 STANOVENÍ ENZYMATICKÝCH AKTIVIT

V experimentech byly stanovovány aktivity Lac, LiP, MnP a mangan-independentních peroxidas (MiP), které pravděpodobně představují aktivitu VP. Enzymové aktivity byly měřeny v supernatantu kultur degradujících Delor 103 (teoretická počáteční koncentrace v kulturách byla 20  $\mu\text{g/ml}$ ) a kultur bez přídavku Deloru 103. V průběhu biodegradačního experimentu byly prováděny odběry supernatantů kultur za sterilních podmínek v pravidelných časových intervalech (3., 7., 10., 14., 17., 21., 24., 28., 31. a 38. den). Enzymové aktivity (Lac, LiP, MnP a MiP) byly měřeny spektrofotometricky na spektrofotometru SPECTRA max PLUS384 (Molecular Devices Corporation, USA). Jedna jednotka enzymové aktivity byla vyjádřena jako množství enzymu, které přemění jeden  $\mu\text{mol}$  enzymatického substrátu za minutu.

### 4.6.1 Lakasa

Lakasová aktivita byla měřena pomocí oxidace ABTS (2,2 – azinodi-3-etylbentotiazolin-6-sulfonát) při  $\lambda = 420 \text{ nm}$  [58] s molárním absorpčním koeficientem ABTS  $\epsilon_{420} = 36000/\text{M/cm}$ . Reakce byla spuštěna přidáním ABTS do reakční směsi.

#### Složení reakční směsi:

- 20  $\mu\text{l}$  vzorku
- 20  $\mu\text{l}$  50 mM ABTS
- 160  $\mu\text{l}$  120 mM octan sodný (pH = 5,0)

### 4.6.2 Mn-dependentní peroxidasa

MnP aktivita byla měřena oxidací 2,6-dimethoxyphenolu (2,6-DMP) při  $\lambda = 468 \text{ nm}$  [59] s molárním absorpčním koeficientem  $\epsilon_{468} = 49600/\text{M/cm}$ . Reakce byla zahájena přidáním 2,6-DMP do reakční směsi.

Hodnoty enzymové aktivity Lac odpovídají naměřeným hodnotám **A** reakční směsi, podle vztahu **Lac = A**. Enzymové aktivity MnP byly vypočteny podle vztahu **MnP = B – C**. Enzymové aktivity MiP byly vypočteny podle vztahu **MiP = C – A**.

**Složení reakční směsi:**

**A = Lac**

20 µl vzorku  
170 µl pufru 65,8 mM Na-malonát, pH = 4,5  
10 µl 20 mM 2,6-DMP

**B = Lac, MnP, MiP**

20 µl vzorku  
152 µl pufru 65,8 mM Na-malonát, pH = 4,5  
10 µl MnSO<sub>4</sub>  
10 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
10 µl 20 mM 2,6-DMP

**C = Lac, MiP**

20 µl vzorku  
152 µl pufru 65,8 mM Na-malonát, pH = 4,5  
10 µl EDTA  
10 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
10 µl 20 mM 2,6-DMP

#### **4.6.3 Ligninperoxidasa**

LiP aktivita byla měřena pomocí veratryl alkoholu (VeOH) při  $\lambda = 310$  nm [23] a molárním absorpčním koeficientu  $\epsilon_{310} = 9300/\text{M}/\text{cm}$ . Reakce byla nastartována přidáním VeOH.

**Složení reakční směsi:**

30 µl vzorku  
155 µl 0,1 M Na-vínan, pH = 3,0  
10 µl 54 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
5 µl 25 mM Veratrylalkohol

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 BIODEGRADACE PCB LIGNINOLYTICKÝMI HOUBAMI

Kvantifikační limit (LOQ) pro kongenery PCB byl stanoven jako nejnižší bod kalibračních křivek a byl pro všechny kongenery 0,05 µg/ml, kdy správnost (precision) analýz byla charakterizována relativní směrodatnou odchylkou menší než 20%.

V následující Tab. 4 jsou uvedeny analyzované kongenery a jejich polohy chloru, dále rovnice regrese jednotlivých kalibračních křivek, hodnota spolehlivosti (R) a retenční čas ( $t_R$ ) v minutách.

**Tab. 4 Analyzované kongenery**

Kongenery	Polohy Cl <sup>-</sup>	Rovnice regrese	R <sup>2</sup>	$t_R$ (min)
18	2,2',5	$y = 2,80 \cdot 10^5 x - 3,95 \cdot 10^4$	0,999	33,0
17	2,2',4	$y = 2,44 \cdot 10^5 x - 3,73 \cdot 10^4$	0,998	33,2
32	2,4',6	$y = 2,02 \cdot 10^5 x - 2,91 \cdot 10^4$	0,999	34,4
16	2,2',3	$y = 2,74 \cdot 10^5 x - 3,94 \cdot 10^4$	0,998	34,5
28+31	2,4,4' + 2,4',5	$y = 3,33 \cdot 10^5 x - 1,35 \cdot 10^4$	0,998	36,7
33	2',3,4	$y = 2,15 \cdot 10^5 x - 5,74 \cdot 10^4$	0,998	37,4
22	2,3,4'	$y = 2,31 \cdot 10^5 x - 6,75 \cdot 10^4$	0,999	38,0
45	2,2',3,6	$y = 2,46 \cdot 10^5 x - 9,52 \cdot 10^3$	0,999	38,2
52	2,2',3,6'	$y = 2,45 \cdot 10^5 x - 2,11 \cdot 10^4$	0,998	39,4
49	2,2',4,5	$y = 2,41 \cdot 10^5 x - 1,61 \cdot 10^4$	0,999	39,6
48+47	2,2,4,5 + 2,2',4,4'	$y = 2,49 \cdot 10^5 x - 4,52 \cdot 10^4$	0,998	39,8
44	2,2',3,5'	$y = 2,11 \cdot 10^5 x - 1,99 \cdot 10^4$	0,998	40,8
42	2,2',3,4'	$y = 1,27 \cdot 10^5 x - 1,58 \cdot 10^4$	0,999	41,0
37	3,4,4'	$y = 8,43 \cdot 10^4 x - 1,08 \cdot 10^3$	0,999	41,3
74	2,4,4',5	$y = 1,69 \cdot 10^5 x - 3,26 \cdot 10^4$	0,998	43,5
70-76	2,3',4',5 - 2',3,4,5	$y = 1,67 \cdot 10^5 x - 3,55 \cdot 10^4$	0,999	43,9
95	2,2',3,5',6	$y = 9,57 \cdot 10^4 x - 5,78 \cdot 10^3$	0,999	44,1
66	2,3',4,4'	$y = 1,22 \cdot 10^5 x - 1,98 \cdot 10^4$	0,999	44,0
56+60	2,3,3',4' + 2,3,4,4'	$y = 1,21 \cdot 10^5 x - 3,21 \cdot 10^4$	0,999	45,3
101	2,2',4,5,5'	$y = 1,22 \cdot 10^5 x + 3,62 \cdot 10^4$	0,998	45,8
99+113	2,2',4,4',5	$y = 1,46 \cdot 10^5 x - 9,88 \cdot 10^4$	0,999	46,1
110	2,3,3',4',6	$y = 1,08 \cdot 10^5 x + 2,29 \cdot 10^4$	0,999	48,3
149	2,2',3,4',5',6	$y = 5,53 \cdot 10^4 x + 4,51 \cdot 10^2$	0,999	50,0
118	2,3',4,4',5	$y = 1,04 \cdot 10^5 x - 9,83 \cdot 10^3$	0,999	50,3
105	2,3,3',4,4'	$y = 8,24 \cdot 10^4 x - 9,30 \cdot 10^3$	0,998	52,2

Výtěžnost extrakce byla zjištěna srovnáním analýz původního roztoku PCB určeného pro kontaminaci houbových kultur a výsledků analýz kontrolních vzorků (HK). Ve všech případech byla výtěžnost stejná, nebo vyšší než 90 %.

Jedním z cílů této práce bylo charakterizovat schopnost biodegradace PCB pomocí osmi kmenů hub bílé hniloby v uměle kontaminované tekuté půdě za různých fyziologických podmínek tj. v přesně definovaném dusíkem limitovaném minerálním médiu KIRK a v komplexním médiu MEG.

Celkový obsah PCB (tj. suma analyzovaných kongenerů PCB) byl naměřen v kontrolním vzorku (HK) a činil  $143,85 \pm 14,7 \mu\text{g}$  v KIRK médiu a  $153,08 \pm 16,2 \mu\text{g}$  v MEG médiu. Schopnost biodegradace (úbytku) sumy analyzovaných kongenerů u vybraných zástupců ligninolytických hub je zobrazena v Tab. 5 v procentech vztažených k abiotické kontrole. *P. ostreatus* v KIRK a MEG médiu nejlépe degradoval celkovou směs PCB. V KIRK médiu byla zaznamenána rovněž účinná biodegradace PCB u *I. lacteus* a v MEG médiu u *B. adusta*.

**Tab. 5 Biodegradace sumy PCB Deloru 103 lininolytickými houbami v [%] vztažených k HK**

Ligninolytická houba	KIRK		MEG	
	1. odběr	2. odběr	1. odběr	2. odběr
<i>B. adusta</i>	27,6	45,6	52,6	89,4
<i>D. squalens</i>	33,7	58,9	14,3	43,5
<i>I. lacteus</i>	56,1	69,7	11,9	44,8
<i>P. chrysosporium</i>	41,6	60,4	32,3	65,1
<i>P. magnoliae</i>	51,5	57,1	38,4	46,2
<i>P.ostreatus</i>	97,1	99,4	95,8	98,4
<i>P. cinnabarinus</i>	41,6	37,2	25,7	48,2
<i>T. versicolor</i>	40,3	59,3	43,3	53,8

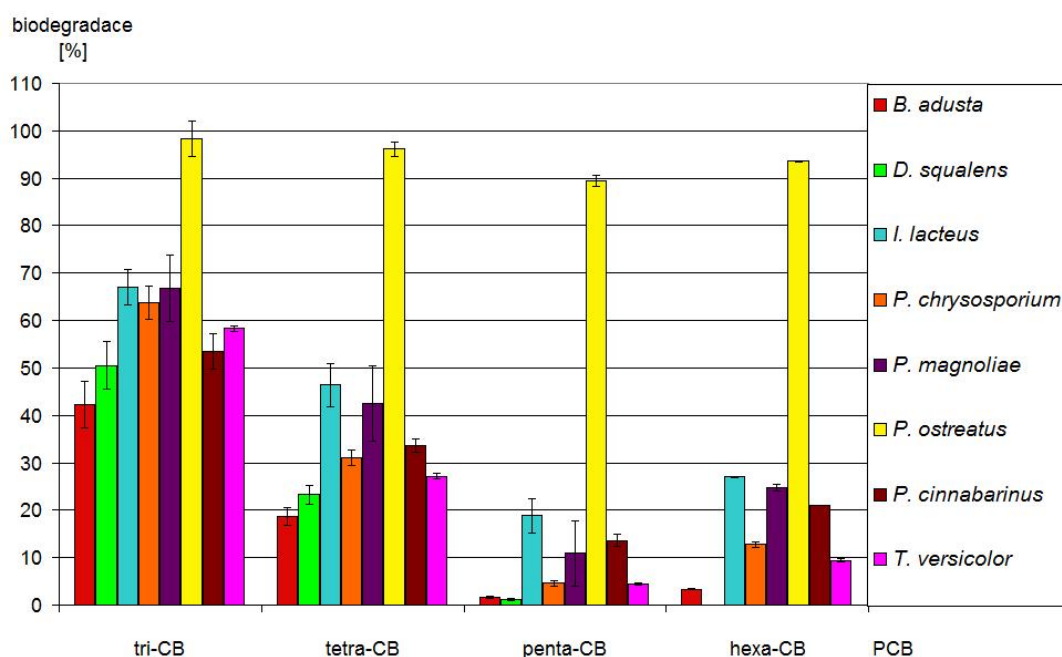
V rámci biodegradačního experimentu byl studován rozsah biodegradace v závislosti na stupni chlorace PCB tzn. potvrzení obecného trendu u hub bílé hniloby, že účinnost biodegradace stoupá s klesajícím počtem atomu chloru

v molekule [50], [33], [49], [48]. Bylo provedeno srovnání biodegradace kongenerových skupin (tri-, tetra-, penta- a hexa-CB) ve vzorcích tekuté půdy v přítomnosti jednotlivých zástupců ligninolytických hub po 1. a 2. odběru na KIRK a MEG médiu, viz Obr. 6, Obr. 7, Obr. 8 a Obr. 9.

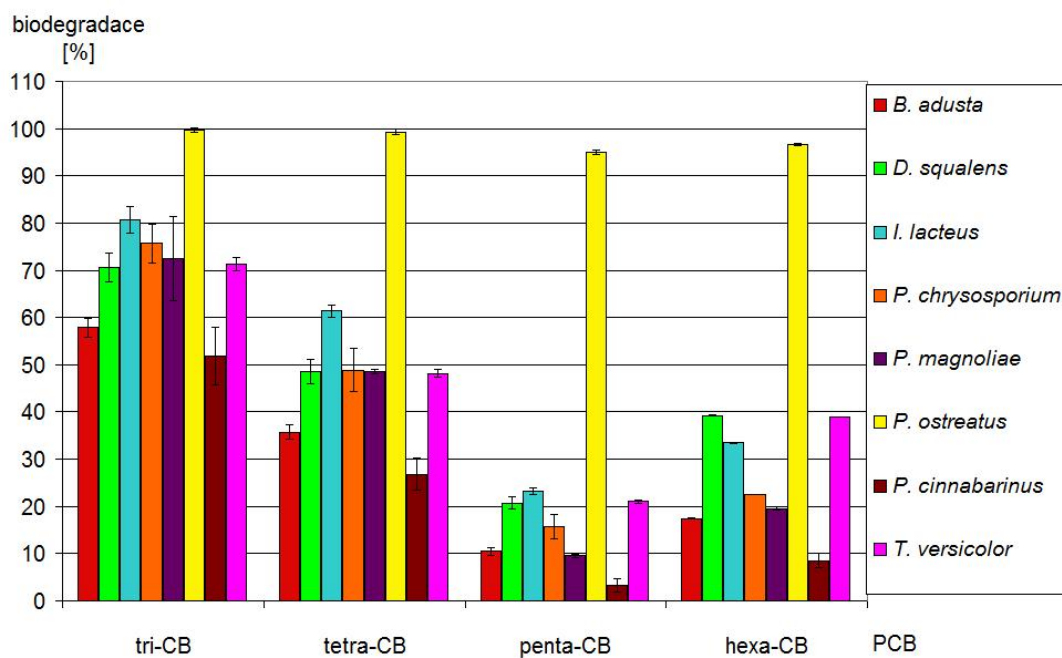
Z obrázků lze usuzovat, že za daných podmínek jsou účinkem vybraných zástupců ligninolytických hub nejvíce degradovány nízkochlorované bifenyly. V případě KIRK média byla pozorována degradace tri-CB po 1. odběru u všech kmenů v rozmezí 42,3 - 98,2 % a po 2. odběru 57,8 - 99,7 %. V MEG médiu byla pozorována degradace tri-CB po 1. odběru v rozmezí 63,6 - 98,6 % a po 2. odběru 77,7 - 99,6 %. Z těchto výsledků vyplývá, že nízkochlorované kongenery PCB jsou za daných podmínek relativně snadno degradovány. Při porovnání různých fyziologických podmínek byla sledována úspěšnější biodegradace tri-CB v komplexním MEG médiu.

Tetra-CB byly degradovány v menším rozsahu než tri-CB, kromě kmene *P. ostreatus*. V KIRK médiu byla pozorována degradace po 1. odběru v rozmezí 18,6 - 96,1 % a po 2. odběru 26,8 - 99,2 %. V případě MEG média byla pozorována degradace po 1. odběru v rozmezí 12,3 - 93,9 % a po 2. odběru 26,7 - 97,5 %. Při biodegradaci tetra-CB byly pozorovány větší rozdíly mezi jednotlivými kmeny, než tomu bylo u tri-CB. Nevyšší úroveň biodegradace tetra-CB byl nalezen v KIRK médiu u *P. ostreatus* (po 1. odběru 96,1 % a po 2. odběru 99,2 %) a *I. lacteus* (po 1. odběru 46,3 % a po 2. odběru 61,4 %) a v MEG médiu u *P. ostreatus* (po 1. odběru 93,9 % a po 2. odběru 97,5 %) a *B. adusta* (po 1. odběru 37,4 % a po 2. odběru 85,4 %). Při porovnání různých fyziologických podmínek byla pozorována úspěšnější biodegradace tetra-CB v KIRK médiu.

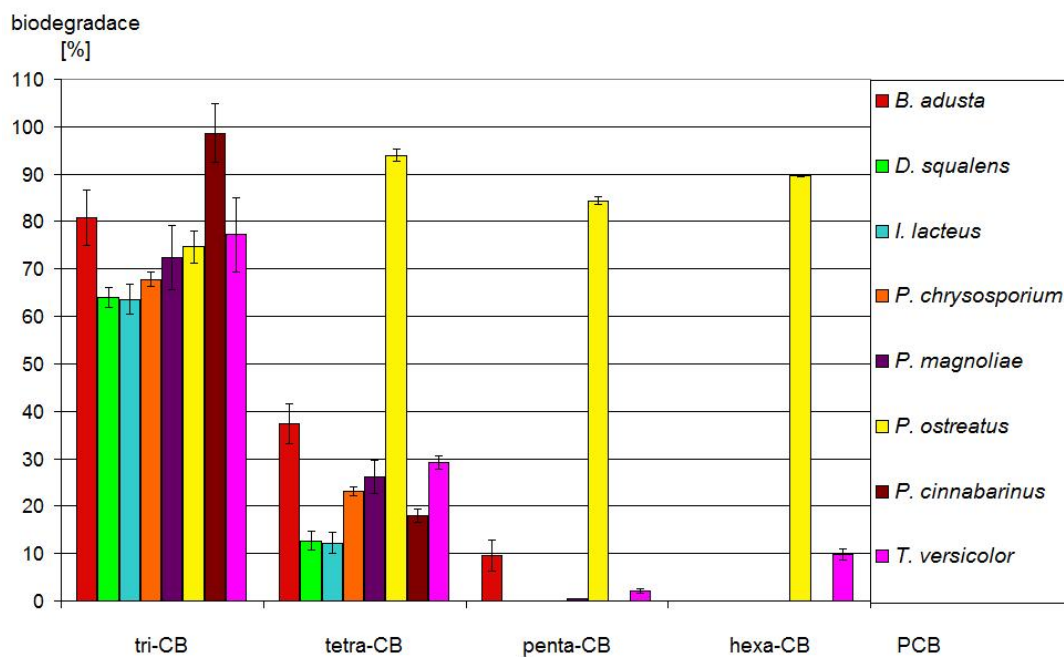
Dále bylo zjištěno, že s rostoucím počtem chlóru došlo k poklesu schopnosti biodegradace a nebo k biodegradaci vůbec nedocházelo. V některých případech nebyly penta- a hexa-CB biodegradovány, pouze *P. ostreatus* vykazoval vysoký stupeň biodegradace (přibližně 90 %) v KIRK i MEG médiu po 1. a 2. odběru a *B. adusta* byla schopná biodegradovat přibližně 70 % analyzovaných kongenerů v MEG médiu po 2. odběru.



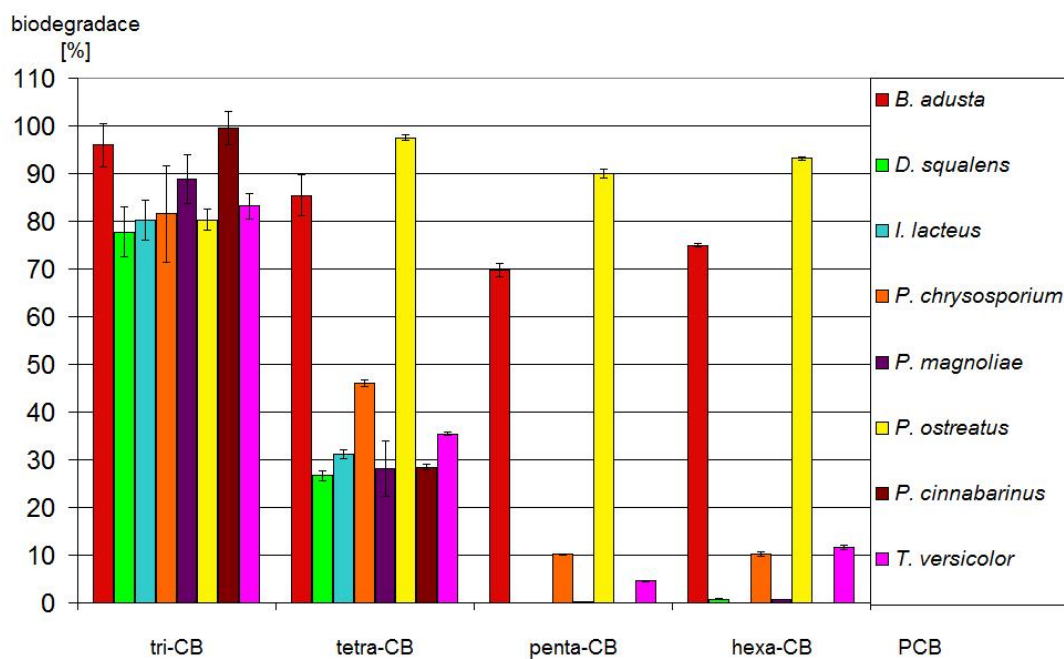
**Obr. 6 Biodegradace tri-, tetra-, penta- a hexa-CB Deloru 103 ligninolýtickými houbami v KIRK médiu po 1. odběru vztažený ke kontrole HK**



**Obr. 7 Biodegradace tri-, tetra-, penta- a hexa-CB Deloru 103 ligninolýtickými houbami v KIRK médiu po 2. odběru vztažený ke kontrole HK**



Obr. 8 Biodegradace tri-, tetra-, penta- a hexa-CB Deloru 103 ligninolytickými houbami v MEG médiu po 1. odběru vztažený ke kontrole HK



Obr. 9 Biodegradace tri-, tetra-, penta- a hexa-CB Deloru 103 ligninolytickými houbami v MEG médiu po 2. odběru vztažený ke kontrole HK



Po biodegradačním experimentu za daných podmínek bylo provedeno vyhodnocení účinnosti biodegradace jednotlivých analyzovaných kongenerů. Následně jsou na obrázcích znázorněny výsledky biodegradace Deloru 103 jednotlivými zástupci ligninolytických hub v KIRK a MEG médiu po 1. a 2. odběru současně s HK, viz Obr. 10 až Obr. 25. Z těchto obrázků rovněž vyplývá, že výrazná biodegradace schopnost jednotlivých kongenerů byla prokázána u *P. ostreatus* v KIRK a MEG médiu. Dále byla prokázána značná biodegradace (s výjimkou některých *penta-* a *hexa*-CB) u *B. adusta* v MEG médiu a u *I. lacteus* v KIRK médiu. U ostatních studovaných ligninolytických hub byla prokázána degradace pouze nízkochlorovaných bifenyli.

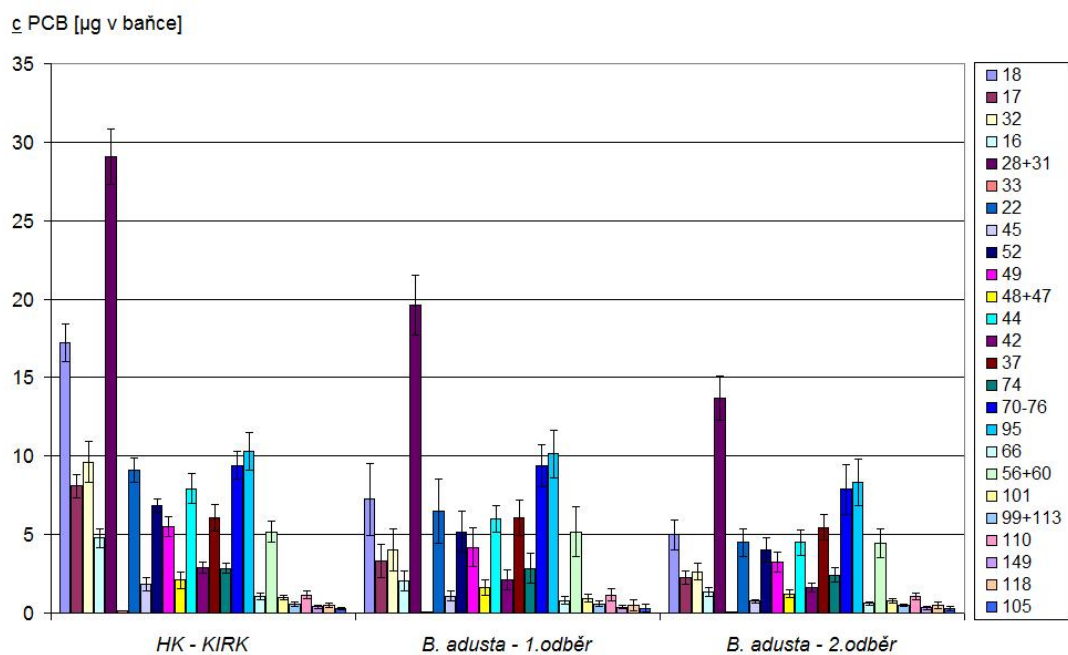
Degradační dráha PCB u bakterií je velmi dobře známa. Například aerobní bakterie degradují především *meta-* a *para-* nižšíchlorované kongenery PCB, viz kapitola 2.3.1. Bakteriální degradace PCB je řízena podle základních principů, které stanovil Fukurava (1994) [37], [37]. Degradační selektivita PCB u ligninolytických hub je také řízena podle určitých pravidel, kdy závisí na struktuře kongeneru PCB. Sterická přístupnost jednotlivých kongenerů pravděpodobně ovlivňuje selektivitu biodegradace. Biodegradabilita klesá s rostoucím počtem substituovaných chlorů v molekule bifenyli. Dva atomy chloru v polohách *para-* (4,4') zvyšují rezistenci k biodegradaci [52].

Účinnost biodegradace u vybraných zástupců ligninolytických hub v tekutých půdách byla vyhodnocována podle počtu substituovaných chlorů v molekule bifenyli. Jednotlivé kongenery byly degradovány v různém rozsahu v závislosti na jejich struktuře, na použité ligninolytické houbě a na fyziologických podmínkách. Účinnost biodegradace tri-CB je v pořadí 17 > 18 nebo 32 > 16 > 33 > 28 + 31 > 22 > 37. Biodegradace byla preferována u kongenerů 16, 17, 18 a 32, které mají dva atomy chloru v *ortho-* pozici. Účinnost biodegradace tetra-CB je nejvyšší pro kongener 45, který má tři atomy chloru v *ortho-* pozici, dále je významná biodegradace u kongenerů 42, 44, 48 + 47, 49 a 52. Nejnižší účinnost biodegradace popřípadě rezistence k biodegradaci byla prokázána u kongenerů 56 + 60, 66, 70 – 76 a 74. Účinnost biodegradace penta-CB u kongenerů 95, 101, 99 + 113, 105, 110 a 118 byla nízká, popřípadě k biodegradaci nedocházelo (s výjimkou

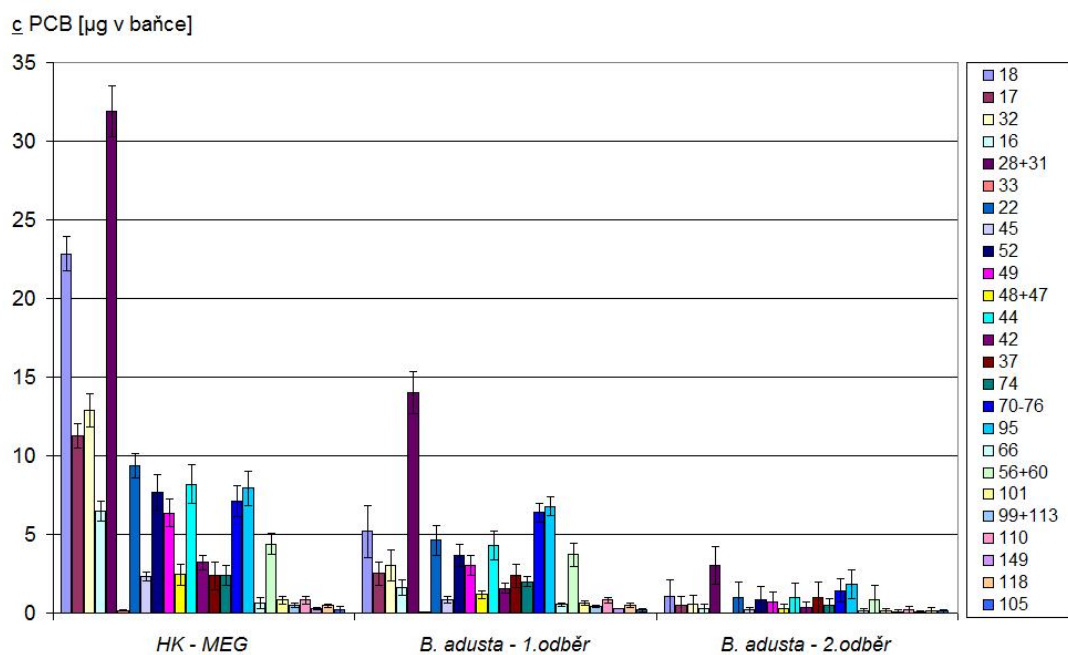
*B. adusta* v MEG médiu po 2. odběru a *P. ostreatus* v KIRK a MEG médiu po 1. a 2. odběru). Vyhodnocování účinnosti biodegradace hexa-CB nebylo charakterizováno, neboť byl analyzován jen jeden kongener 149. Degradální účinnost dramaticky poklesla pro kongenery s dvěma atomy chloru v *para*- pozici tj. 28, 37, 47, 60, 66, 74, 99, 105 a 118.

Výsledky Kubátové a kol. (2001) [50] byly porovnány s výsledky této práce. Po 60 denním biodegradčním experimentu v půdě kontaminované Delorem 103 na výslednou teoretickou koncentraci 10,2 µg/g nebyla zaznamenána degradace PCB u *P. chrysosporium* a *T. versicolor*, ale u čtyř kmenů *P. ostreatus* byla zaznamenána 40% degradace PCB. Zatímco po 42 denním biodegradčním experimentu v rámci této práce byla sledována degradace analyzovaných kongenrů v tekutém KIRK médiu u *P. chrysosporium* 60%, u *P. ostreatus* 99% a u *T. versicolor* 59% a v tekutém MEG médiu u *P. chrysosporium* 65%, u *P. ostreatus* 98% a u *T. versicolor* 54%. Z tohoto porovnání vyplývá, že biodegradční experiment v půdě byl méně účinný než biodegradční experiment v tekutých médiích. Při porovnání účinnosti biodegradace jednotlivých kongenerů PCB u houby *P. ostreatus* byla pozorována podobná závislost.

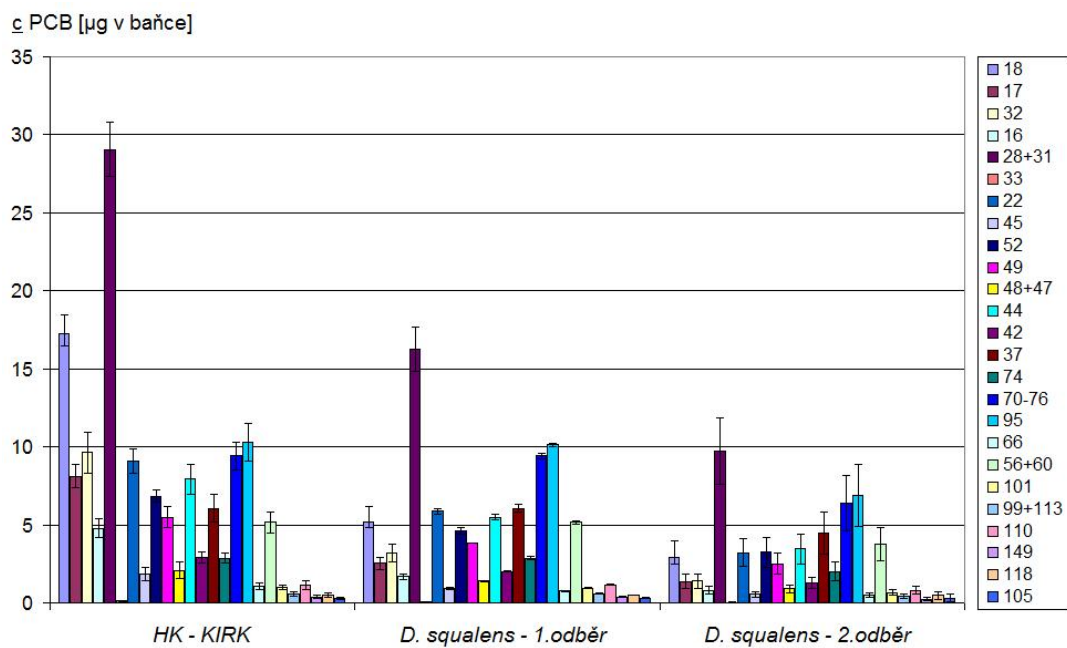
Výsledky Yadav a kol. [48] prezentující schopnost biodegradace směsi Aroclor 1242, 1254 a 1260 v tekutém médiu pomocí *P. chrysosporium* byly také porovnány s výsledky této práce. Yadav a kol. analyzoval jednotlivé kongenery PCB ve třech typech živných médií. Yadav a kol. sledoval nejvýznamnější degradaci po 30 dnech v MEG médiu. Zatímco z naměřených výsledků této práce vyplývá, že biodegradace byla po 28 dnech účinnější na KIRK médiu, ale po 42 dnech na MEG médiu. Tato pozorování jsou významná z hlediska aplikace *P. chrysosporium* v biodegradaci PCB v životním prostředí, kde se může koncentrace živin (zejména dusíku) lišit. Také byla porovnána degradální schopnost jednotlivých kongenerů PCB ve směsi Aroclor a Delor 103 v tekutých médiích. Byla sledována podobná závislost biodegradace jednotlivých kongenerů PCB. Schopnost biodegradace u nízko-chlorovaných bifenylů byla relativně vysoká, u tetra-CB byla nižší a u kongenerů 37, 74, 70 – 76, 95, 66, 56 + 60, 101, 99 + 113, 110, 149, 118 a 105 byla velmi nízká nebo k biodegradaci nedocházelo.



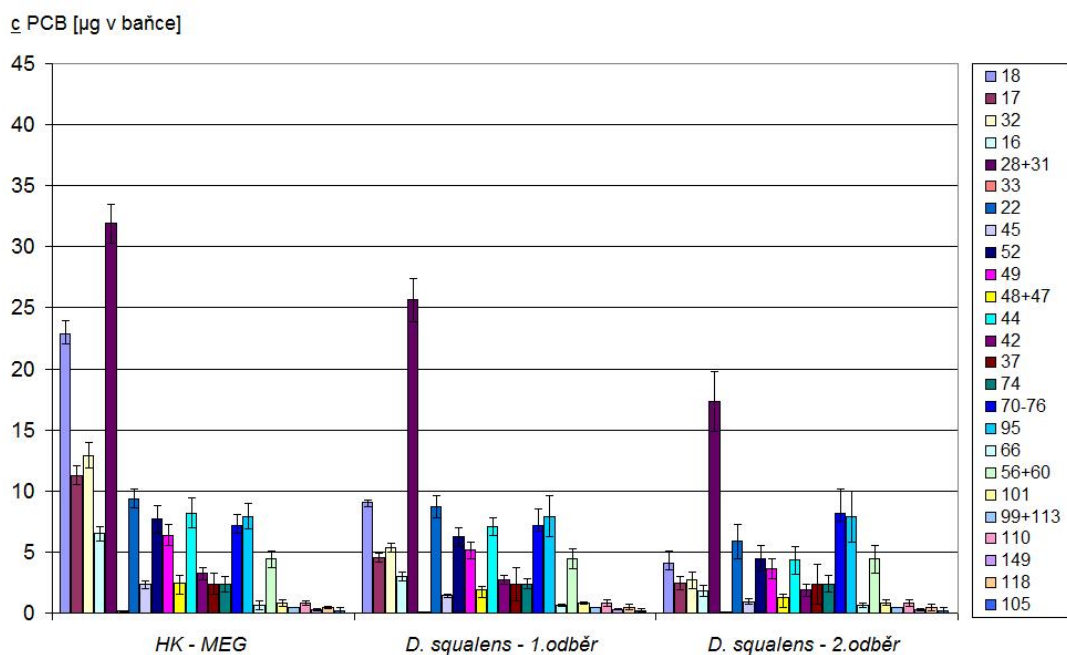
**Obr. 10 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *B. adusta***



**Obr. 11 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *B. adusta***

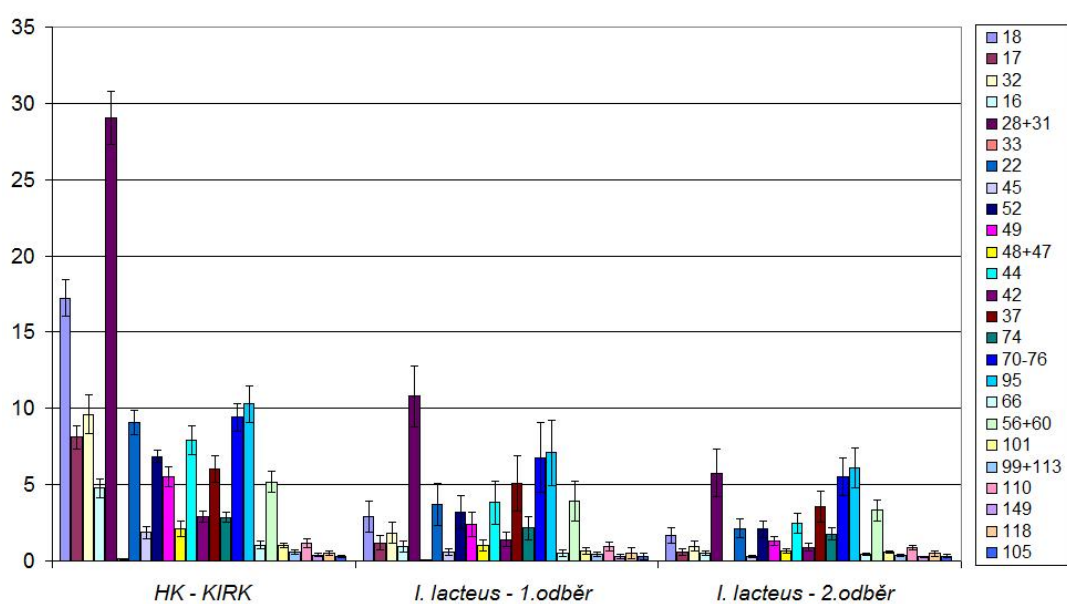


**Obr. 12 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *D. squalens***



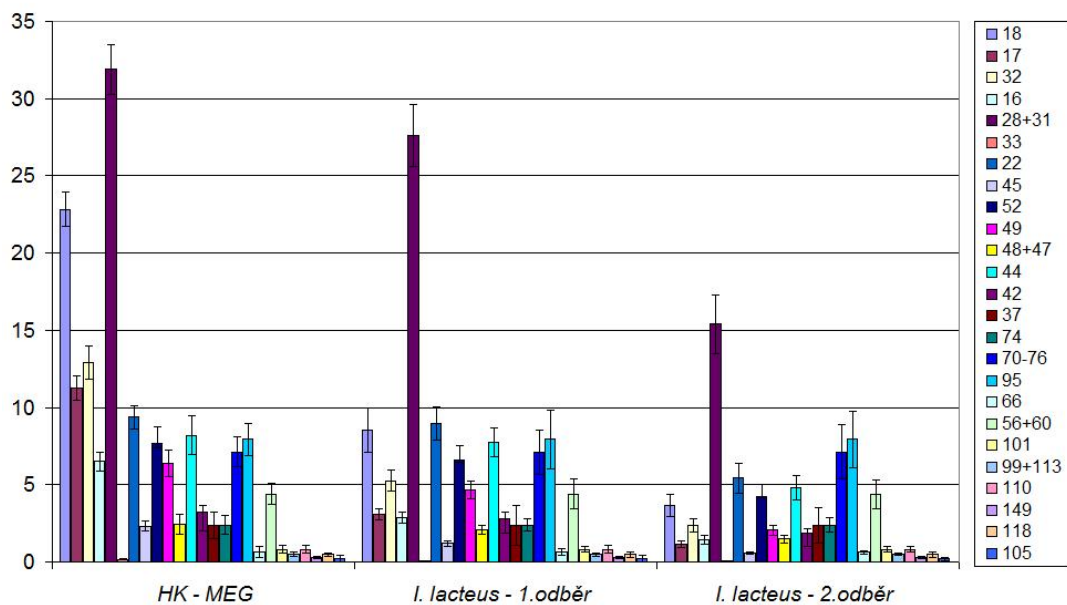
**Obr. 13 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *D. squalens***

c PCB [ $\mu\text{g}$  v baňce]

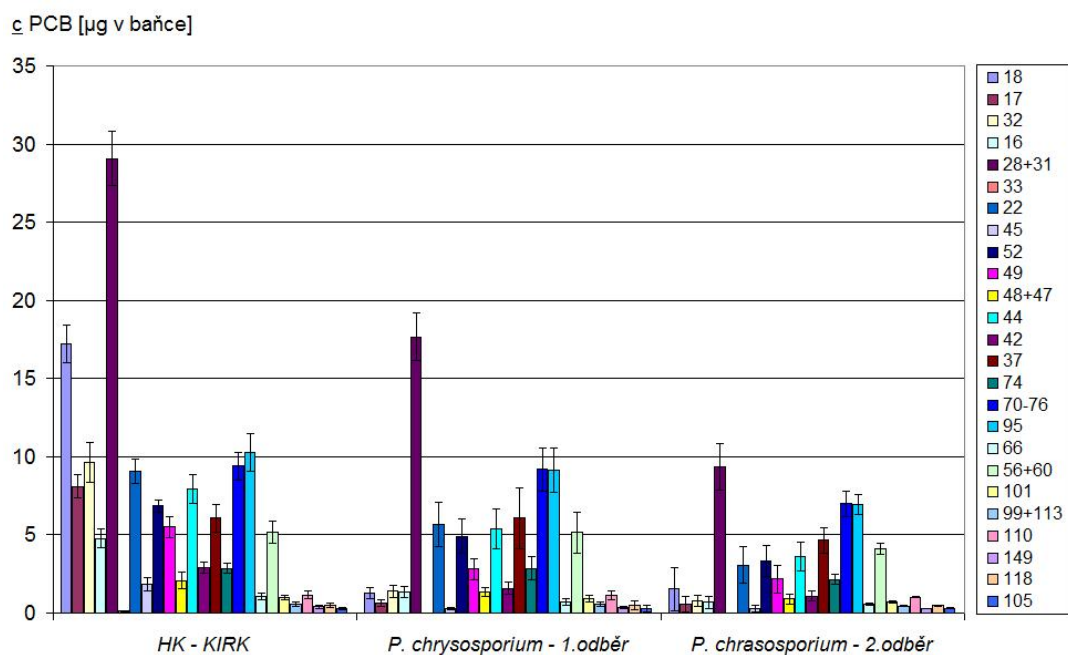


**Obr. 14 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *I. lacteus***

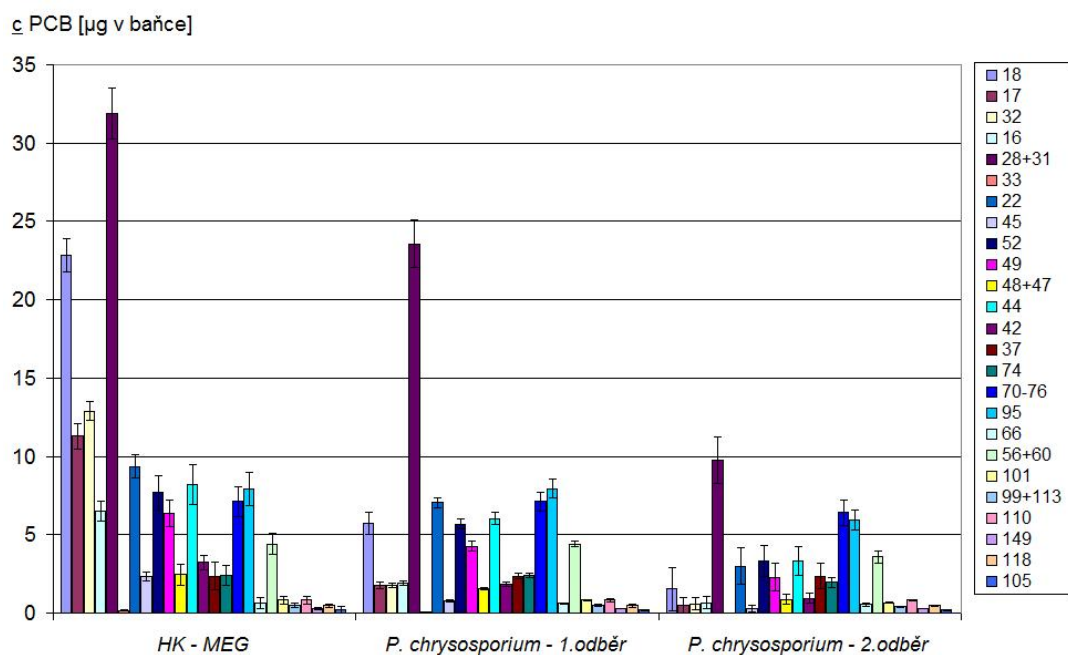
c PCB [ $\mu\text{g}$  v baňce]



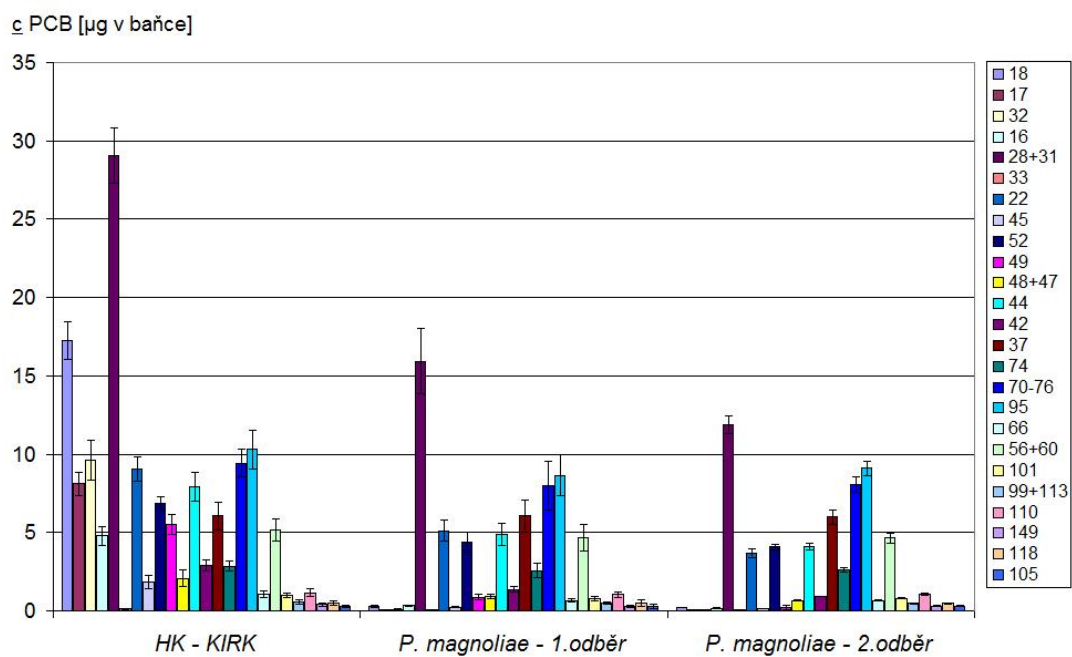
**Obr. 15 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *I. lacteus***



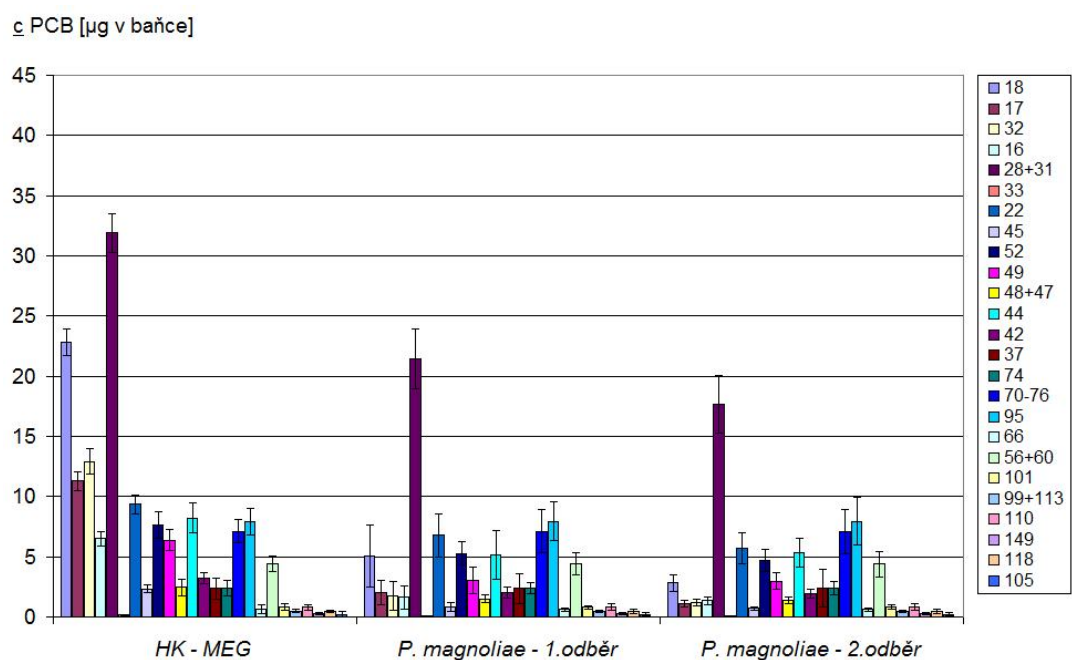
**Obr. 16 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *P. chrysosporium***



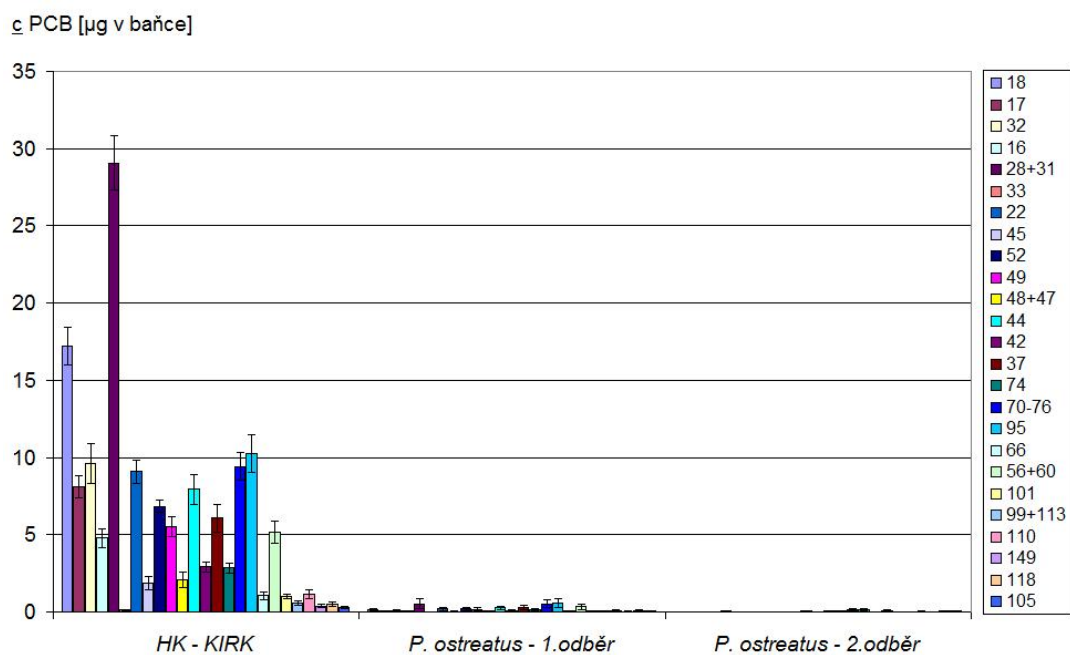
**Obr. 17 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *P. chrysosporium***



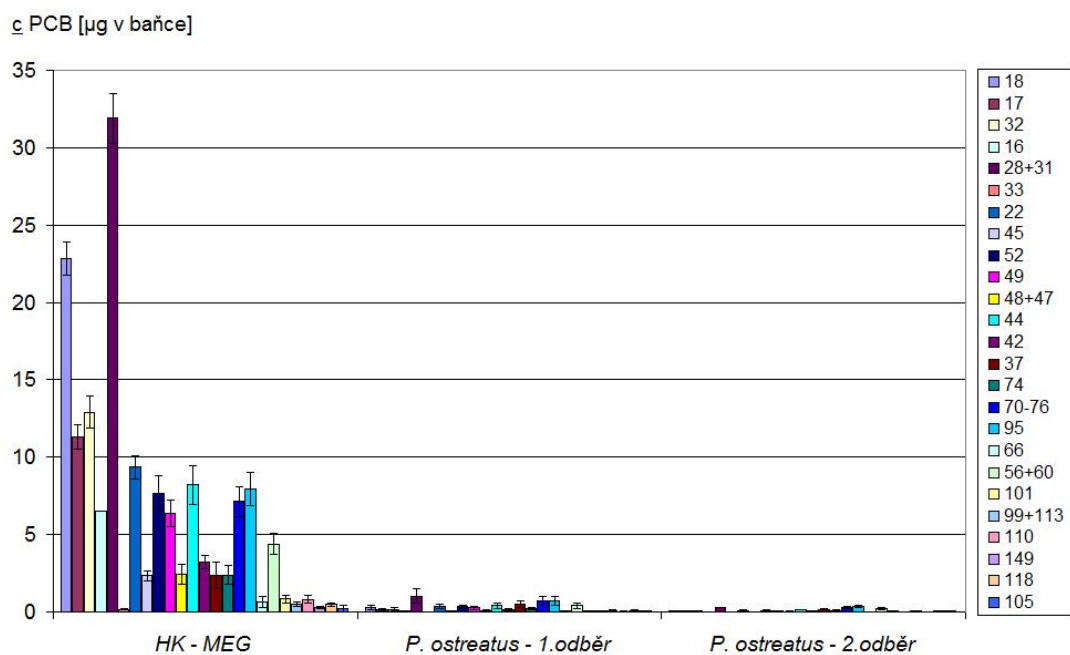
**Obr. 18 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *P. magnoliae***



**Obr. 19 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *P. magnoliae***

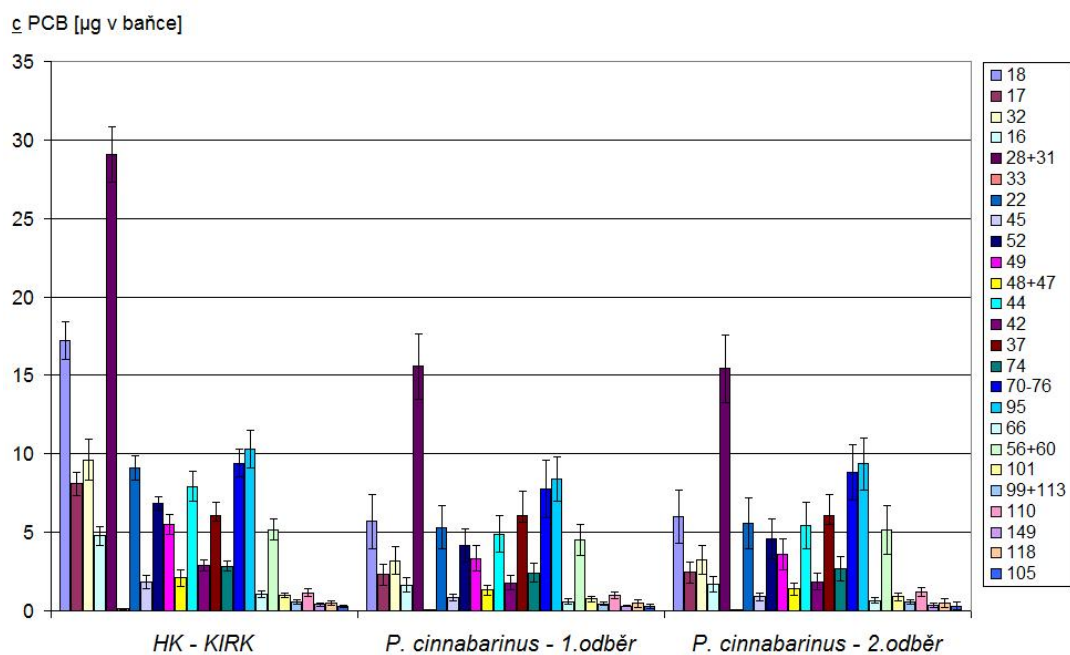


**Obr. 20 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *P. ostreatus***

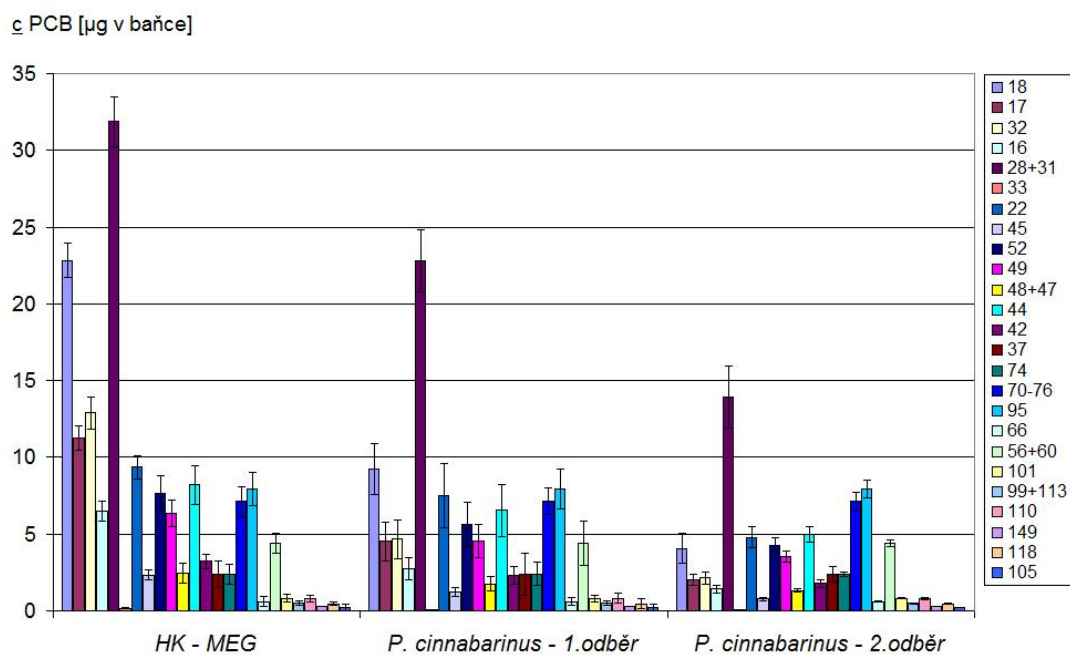


**Obr. 21 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *P. ostreatus***



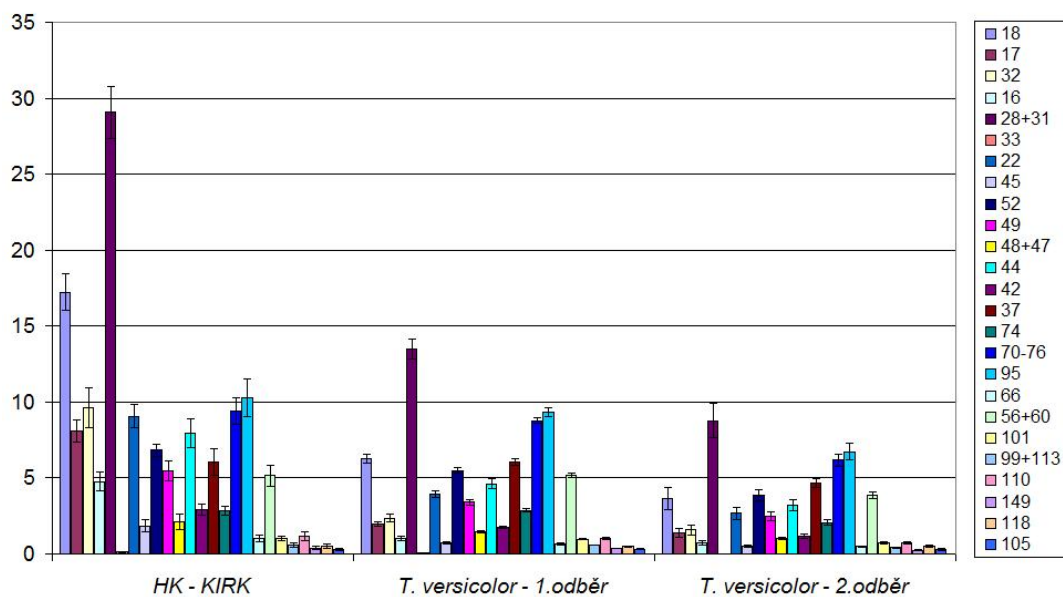


**Obr. 22 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *P. cinnabarinus***



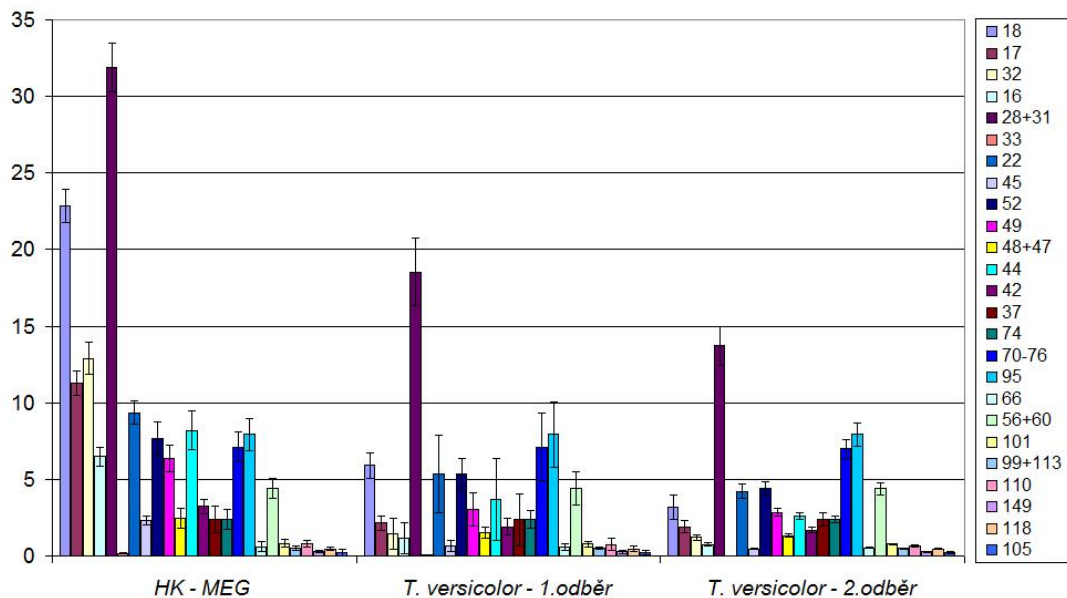
**Obr. 23 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *P. cinnabarinus***

Σ PCB [µg v baňce]



**Obr. 24 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v KIRK médiu pomocí *T. versicolor***

Σ PCB [µg v baňce]



**Obr. 25 Degradace Deloru 103 po 1. odběru (28. dnu) a po 2. odběru (42.dnu)  
v MEG médiu pomocí *T. versicolor***

## 5.2 EKOTOXICITA TEKUTÝCH PŮDNÍCH VZORKŮ

Předmětem studia ekotoxicity tekutých půdních vzorků bylo vyhodnocení změn akutní toxicity v průběhu biodegradace PCB pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub. Stanovení inhibice bioluminiscence emitované bakteriemi *Vibrio fischeri* po 15 min inkubace se vzorky z KIRK a MEG kultur po 1. a 2. odběru jsou uvedeny na Obr. 26, Obr. 27, Obr. 28 a Obr. 29.

Vlastní měření inhibice luminiscence bylo sledováno po 15 min inkubace se vzorkem. Nejprve musela být zjištěna optimální koncentrace roztoku DMSO, tak aby byla zajištěna rozpustnost toxických látek a roztok nebyl toxický pro bakterie. Byla použita koncentrace 4% roztoku DMSO ve 2% roztoku NaCl, který byl smíchán ve stejném objemovém poměru s pracovní suspenzí luminiscenčních bakterií na výslednou koncentraci 2% roztoku DMSO. Poté pomocí koncentrační řady bylo stanoveno vhodné ředění pro HK, které způsobí inhibici lumunistence v měřitelné oblasti, tj. kolem 50 %. Výsledné ředění HK bylo aplikováno na vzorky a ty byly stejným způsobem změřeny [55].

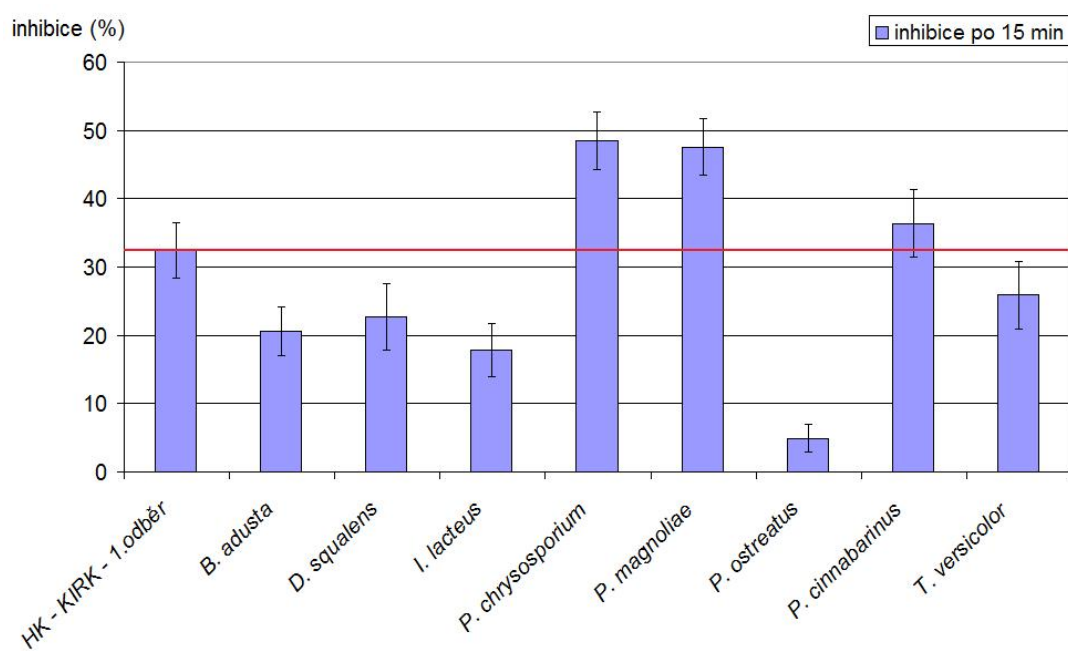
Z výsledků ekotoxikologického testu lze usuzovat zda v průběhu biodegradace vznikají či nevznikají toxičtější metabolity než původní testované PCB. Kontrola obsahuje přídavek Deloru 103, který nepodléhá biodegradaci, neboť v kultivaci byl použit usmrcený *P. ostreatus*. Naměřené hodnoty inhibice bioluminiscence ve vzorku byly porovnány s HK (k porovnání lze použít pomocnou červenou čáru, která se nachází ve vodorovné rovině mezi naměřenými hodnotami inhibice bioluministence po 15 min). Obecně platí, pokud je inhibice bioluministence ve vzorku vyšší než v HK, tak v průběhu biodegradace pravděpodobně vznikají toxické metabolity.

V KIRK médiu po 28 dnech biodegradace (1. odběr) byl sledován pokles akutní toxicity ve srovnání s HK u *B. adusta*, *D. squalens*, *I. lacteus*, *P. ostreatus* a *T. versicolor*; po 42 dnech (2. odběr) jen u *P. ostreatus*.

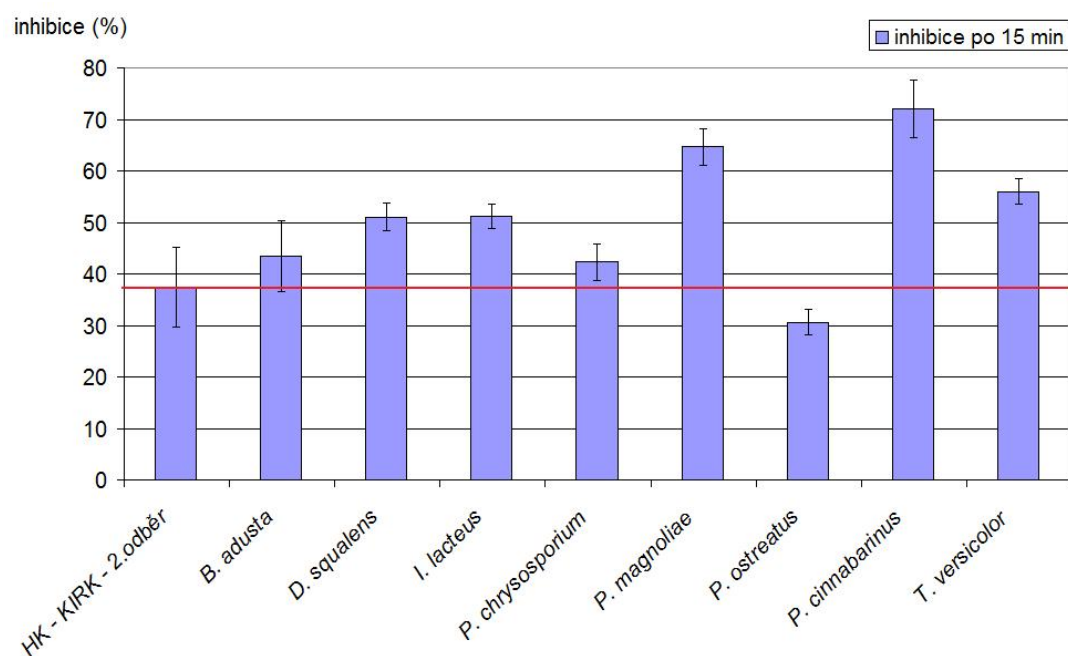
V MEG médiu po 28 dnech biodegradace (1. odběr) byl sledován pokles akutní toxicity ve srovnání s HK u *P. ostreatus*; po 42 dnech (2. odběr) u *P. ostreatus* a *D. squalens*.

Byly porovnány výsledky biodegradačního experimentu s akutní toxicitou. Nejvýznamnější biodegradační schopnost byla pozorována u *P. osreatus* v KIRK a MEG médiu, zde v průběhu biodegradace Deloru 103 byl sledován pokles toxicity v porovnání s HK. Z těchto výsledků lze usuzovat, že *P. ostreatus* je vhodný pro dekontaminaci PCB. Významná biodegradační schopnost byla pozorována u *I. lacteus* v KIRK médiu. U této houby ve srovnání s HK byl po 28 dnech biodegradace sledován pokles toxicity a po 42 dnech vzrůst toxicity. Také významná schopnost biodegradace Deloru 103 byla zjištěna u *B. adusta* v MEG médiu, zde je pozorován vzrůst toxicity ve srovnání s HK v průběhu biodegradace. Z výsledků vyplývá, že v některých případech (*I. lacteus*, *B. adusta*) i v pozdějším čase kultivace docházelo pravděpodobně k tvorbě toxických produktů transformace.

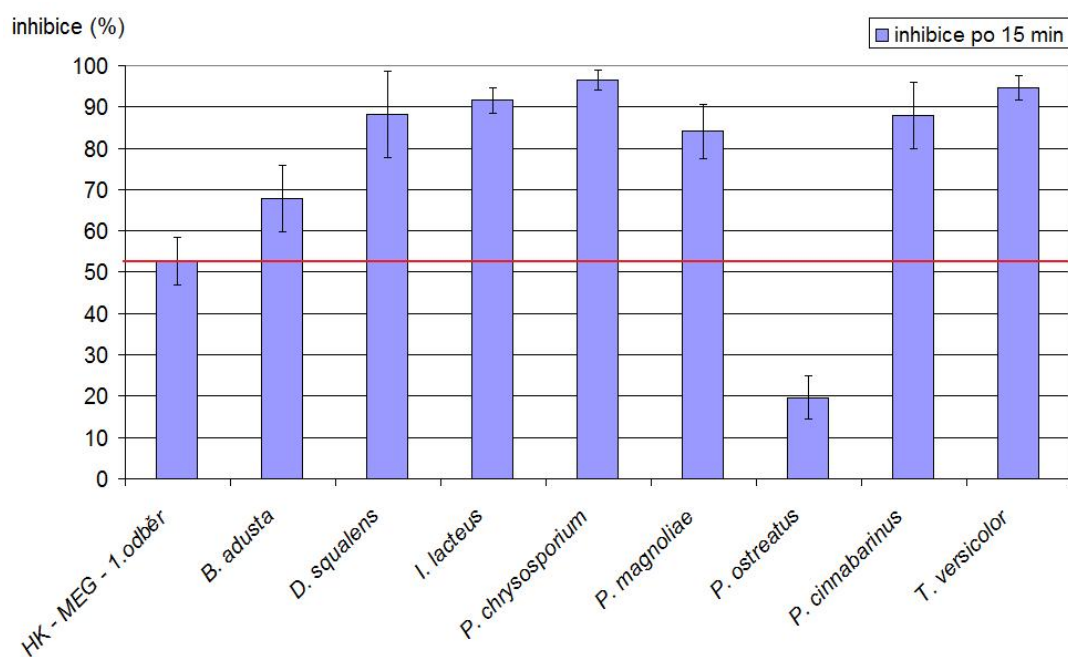
Bioluminiscenční test toxicity pomocí bakterie *Vibrio fischeri* je významná metoda pro vyhodnocování akutní toxicity různých xenobiotik. Výhodou bioluminiscenčního testu toxicity je oproti ostatním biotestům krátký čas potřebný k získání výsledků. V této práci byl čas kontaktu bakterie *Vibrio fischeri* se vzorkem obsahující xenobiotikum pouze 15 min. Další výhodou tohoto testu je nespecifita, která umožňuje sledovat celkovou akutní toxicitu bez znalosti biodegradačních mechanismů.



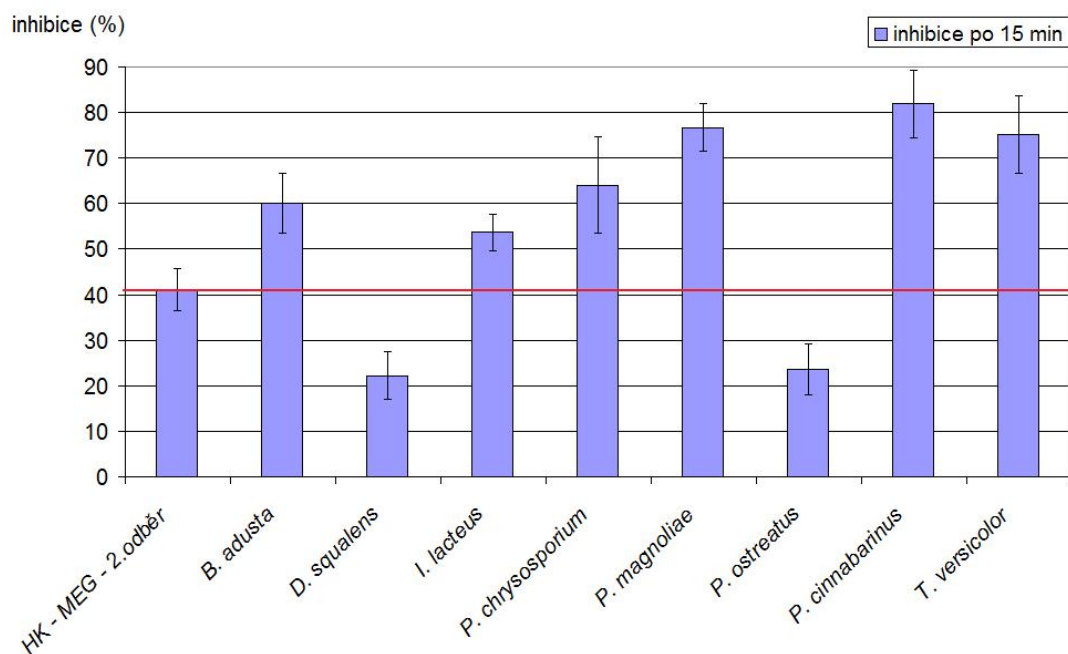
Obr. 26 Stanovení inhibice bioluminiscence pomocí *Vibrio fischeri* v KIRK médiu po 28 dnech



Obr. 27 Stanovení inhibice bioluminiscence pomocí *Vibrio fischeri* v KIRK médiu po 42 dnech



Obr. 28 Stanovení inhibice bioluminiscence pomocí *Vibrio fischeri* v MEG médiu po 28 dnech



Obr. 29 Stanovení inhibice bioluminiscence pomocí *Vibrio fischeri* v MEG médiu po 42 dnech

### 5.3 ENZYMOVÁ AKTIVITA

Předmětem této práce byla rovněž detekce enzymové aktivity ligninolytických enzymů v průběhu biodegradace PCB pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub. Byly stanovovány aktivity enzymů jak s přidavkem Deloru 103 (20 µg/ml), tak i v nekontaminovaných kulturách, a to v obou typech živných médií.

V následujících tabulkách jsou zobrazeny maximální enzymové aktivity (Lac, LiP, MnP a MiP) a jejich směrodatné odchylky naměřené v kulturách bez přidavku Deloru 103 a kulturách s přidavkem Deloru 103 v tekutých médiích (KIRK a MEG) pomocí osmi druhů ligninolytických hub. Dále jsou v tabulkách uvedeny dny, kdy byla dosažena maximální enzymová aktivita.

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *B. adusta* jsou uvedeny v Tab. 6. V kulturách bez přidavku Deloru 103 v KIRK a v MEG médiu nejvyšších hodnot dosáhly aktivity MnP. Kultury kontaminované Delorem 103 vykazovaly výrazně vyšší enzymové aktivity MnP v KIRK i MEG médiu.

**Tab. 6 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *B. adusta* v tekutém médiu bez přidavku a s přidavkem Deloru 103**

	KIRK		MEG	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	ND <sup>1</sup>	4,3 ± 3,1 ( <b>10.</b> ) <sup>2</sup>	1,3 ± 0,4 ( <b>31.</b> )	1,8 ± 2,2 ( <b>24.</b> )
<b>LiP</b>	1,2 ± 1,6 ( <b>14.</b> )	ND	ND	ND
<b>MnP</b>	28,6 ± 5,1 ( <b>10.</b> )	52,7 ± 3,5 ( <b>24.</b> )	44,5 ± 6,8 ( <b>10.</b> )	62,0 ± 7,1 ( <b>17.</b> )
<b>MiP</b>	1,9 ± 0,8 ( <b>21.</b> )	2,1 ± 0,9 ( <b>14.</b> )	2,9 ± 1,9 ( <b>17.</b> )	7,4 ± 0,4 ( <b>21.</b> )

<sup>1</sup> znamená nedetekováno (not detected)

<sup>2</sup> den, kdy byla dosažena maximální enzymová aktivita

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *D. squalens* jsou uvedeny v Tab. 7. V kulturách bez přídavku Deloru 103 v KIRK a v MEG médiu byly detekovány aktivity Lac. Kultury kontaminované Delorem 103 v KIRK i MEG médiu vykazovaly výrazně vyšší enzymové aktivity.

**Tab. 7 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *D. squalens* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	KIRK		MEG	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	8,9 ± 2,0 <b>(31.)</b>	30,3 ± 2,9 <b>(38.)</b>	11,1 ± 2,6 <b>(24.)</b>	82,1 ± 6,3 <b>(10.)</b>
<b>LiP</b>	1,8 ± 0,3 <b>(17.)</b>	ND	ND	4,9 ± 2,7 <b>(17.)</b>
<b>MnP</b>	10,5 ± 0,1 <b>(21.)</b>	1,5 ± 2,1 <b>(24.)</b>	3,3 ± 2,7 <b>(38.)</b>	11,4 ± 4,2 <b>(24.)</b>
<b>MiP</b>	ND	2,8 ± 1,6 <b>(31.)</b>	ND	3,7 ± 1,2 <b>(31.)</b>

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *I. lacteus* jsou uvedeny v Tab. 8. V kulturách bez přídavku Deloru 103 v KIRK a v MEG médiu byly detekovány aktivity MnP. Také kultury kontaminované Delorem 103 v KIRK a v MEG médiu vykazovaly přibližně stejné enzymové aktivity MnP.

**Tab. 8 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *I. lacteus* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	KIRK		MEG	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	2,3 ± 1,7 <b>(17.)</b>	4,1 ± 3,8 <b>(17.)</b>	3,2 ± 2,7 <b>(17.)</b>	5,1 ± 3,7 <b>(7.)</b>
<b>LiP</b>	ND	ND	ND	ND
<b>MnP</b>	46,4 ± 0,2 <b>(10.)</b>	45,2 ± 6,7 <b>(17.)</b>	46,7 ± 2,8 <b>(10.)</b>	35,2 ± 5,8 <b>(17.)</b>
<b>MiP</b>	ND	1,1 ± 0,4 <b>(14.)</b>	1,2 ± 0,1 <b>(21.)</b>	3,8 ± 3,2 <b>(21.)</b>



Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *P. chrysosporium* jsou uvedeny v Tab. 9. Aktivity ligninolytických enzymů byly velice nízké, nebo nebyly detekovány, ve všech kulturách.

**Tab. 9 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *P.chrysosporium* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	<b>KIRK</b>		<b>MEG</b>	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	6,4 ± 1,1 <b>(17.)</b>	1,8 ± 2,6 <b>(31.)</b>	12,0 ± 4,2 <b>(31.)</b>	ND
<b>LiP</b>	ND	ND	ND	ND
<b>MnP</b>	8,2 ± 0,4 <b>(14.)</b>	2,0 ± 2,7 <b>(10.)</b>	ND	ND
<b>MiP</b>	ND	ND	ND	ND

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *P. magnoliae* jsou uvedeny v Tab. 10. V kulturách bez i s přidavkem Deloru 103 v KIRK médiu byla detekována aktivita MnP. Naměřené hodnoty MnP byly nižší v kontaminovaných kulturách.

**Tab. 10 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *P. magnoliae* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	<b>KIRK</b>		<b>MEG</b>	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	4,0 ± 2,0 <b>(28.)</b>	5,9 ± 4,3 <b>(31.)</b>	1,7 ± 1,4 <b>(38.)</b>	ND
<b>LiP</b>	ND	ND	4,7 ± 3,6 <b>(24.)</b>	ND
<b>MnP</b>	37,6 ± 4,3 <b>(17.)</b>	22,6 ± 6,0 <b>(17.)</b>	ND	ND
<b>MiP</b>	2,9 ± 3,7 <b>(24.)</b>	1,7 ± 1,5 <b>(21.)</b>	ND	ND

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *P. ostreatus* jsou uvedeny v Tab. 11. V kulturách bez přídavku Deloru 103 v KIRK a především v MEG médiu byly detekovány aktivity Lac. V kulturách s Delorem 103 nebyly detekovány významné aktivity ligninolytických enzymů.

**Tab. 11 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *P. ostreatus* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	KIRK		MEG	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	14,2 ± 1,0 <b>(10.)</b>	7,5 ± 3,1 <b>(31.)</b>	102,6 ± 6,3 <b>(10.)</b>	4,6 ± 2,7 <b>(38.)</b>
<b>LiP</b>	2,5 ± 3,6 <b>(28.)</b>	ND	ND	ND
<b>MnP</b>	1,1 ± 0,4 <b>(10.)</b>	ND	3,2 ± 1,8 <b>(21.)</b>	ND
<b>MiP</b>	ND	ND	2,2 ± 1,1 <b>(10.)</b>	ND

Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *P. cinnabarinus* jsou uvedeny v Tab. 12. V kulturách bez přídavku Deloru 103 v KIRK i MEG médiu byly detekovány aktivity Lac. Kontaminované kultury Delorem 103 především v KIRK a v MEG médiu vykazovaly výrazně vyšší enzymové aktivity Lac. Pouze v KIRK kulturách bylo sledováno navýšení aktivit LiP po přidání Deloru 103 do kultur.

**Tab. 12 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *P. cinnabarinus* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

	KIRK		MEG	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	10,0 ± 2,1 <b>(28.)</b>	117,5 ± 9,9 <b>(28.)</b>	7,9 ± 3,6 <b>(21.)</b>	14,1 ± 4,4 <b>(10.)</b>
<b>LiP</b>	1,8 ± 2,6 <b>(21.)</b>	11,4 ± 1,6 <b>(24.)</b>	14,6 ± 9,0 <b>(21.)</b>	15,4 ± 2,2 <b>(21.)</b>
<b>MnP</b>	ND	18,2 ± 5,6 <b>(24.)</b>	ND	7,7 ± 0,1 <b>(14.)</b>
<b>MiP</b>	ND	ND	1,6 ± 2,2 <b>(14.)</b>	3,0 ± 4,2 <b>(21.)</b>

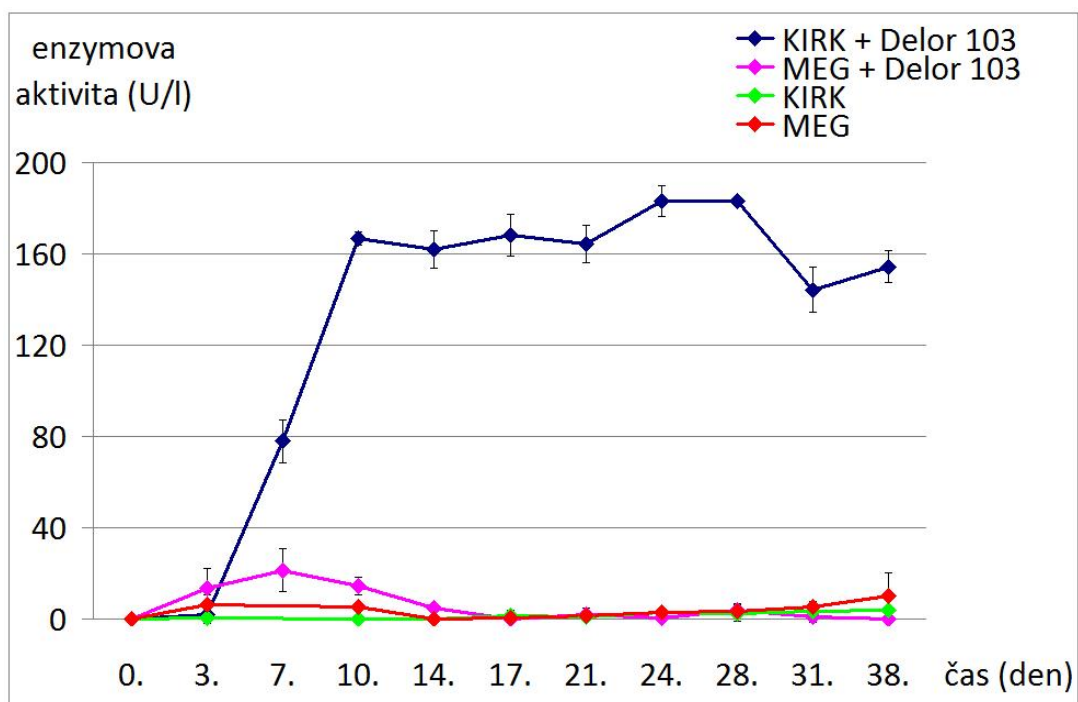
Aktivity Lac, LiP, MnP a MiP produkované houbovými kulturami *T. versicolor* jsou uvedeny v Tab. 13. V kulturách bez přídavku Deloru 103 v KIRK i MEG médiu byly detekovány aktivity Lac. Kultury kontaminované Delorem 103 v KIRK i MEG médiu vykazovaly výrazně vyšší enzymové aktivity.

**Tab. 13 Maximální aktivity (U/l) ligninolytických enzymů pomocí *T. versicolor* v tekutém médiu v přítomnosti Deloru 103**

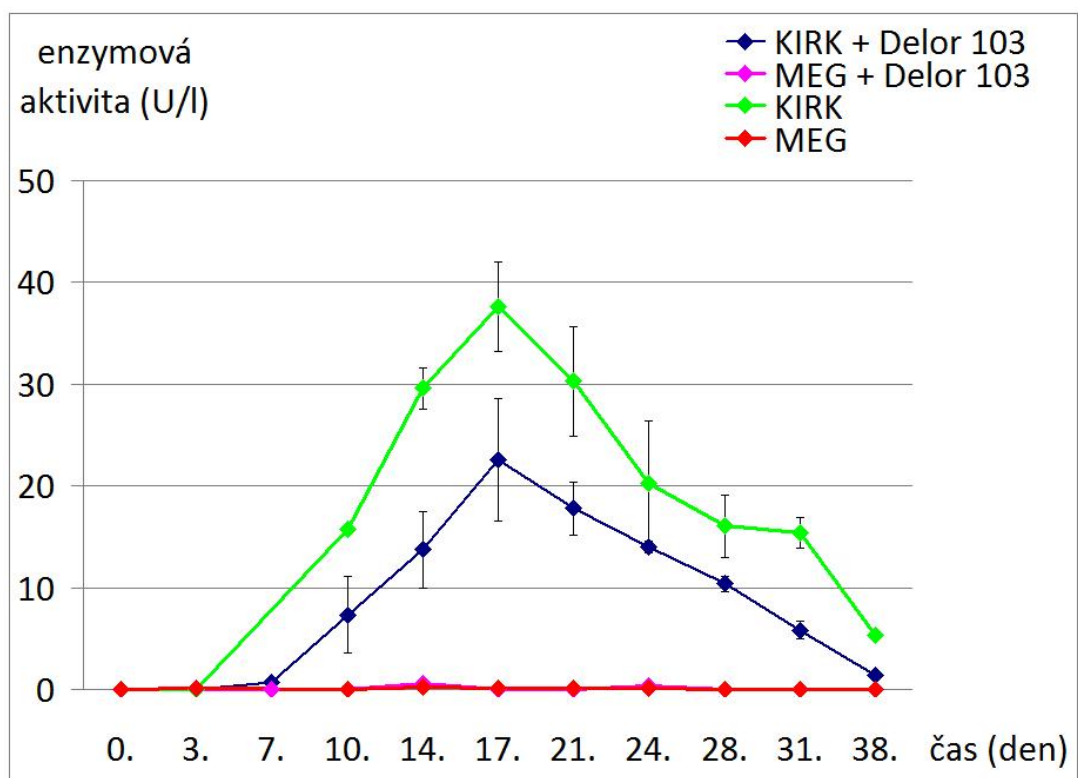
	<b>KIRK</b>		<b>MEG</b>	
	Bez PCB	Delor 103	Bez PCB	Delor 103
<b>Lac</b>	3,8 ± 5,3 <b>(38.)</b>	183,0 ± 6,7 <b>(24.)</b>	6,0 ± 4,6 <b>(3.)</b>	21,4 ± 9,5 <b>(7.)</b>
<b>LiP</b>	ND	ND	ND	ND
<b>MnP</b>	4,2 ± 2,0 <b>(10.)</b>	1,8 ± 1,5 <b>(10.)</b>	ND	5,3 ± 2,5 <b>(7.)</b>
<b>MiP</b>	1,4 ± 1,0 <b>(17.)</b>	1,2 ± 0,7 <b>(10.)</b>	ND	1,3 ± 0,8 <b>(17.)</b>

K výsledkům enzymové aktivity jsou prezentovány dva vybrané grafy, znázorňující produkci enzymové aktivity sledovanou v čase v tekutých médiích (KIRK a MEG) v kulturách degradující Delor 103 a v kulturách bez přídavku Deloru 103. Na prvním grafu je znázorněna produkce Lac v případě houby *T. versicolor*, kdy došlo k indukci této aktivity na 180 U/l po přidání Deloru 103 v KIRK médiu, viz Obr. 30. Na druhém grafu je znázorněna produkce MnP v případě houby *P. magnoliae*, zde je sledována inhibice enzymové aktivity MnP po přidání Deloru 103, viz Obr. 31.

Ze srovnání výsledků toxicity a aktivit ligninolytických enzymů vyplývá, že na poklesu toxicity, ve smyslu další degradace metabolitů PCB, se mohou podílet rovněž ligninolytické enzymy. Byl zejména zaznamenán pokles toxicity u *D. squalens*, *I. lacteus*, *P. ostreatus* a *T. versicolor* a u těchto hub byla naměřena aktivita Lac, což naznačuje možnou další roli tohoto enzymu.



Obr. 30 Enzymová aktivita Lac v tekutých půdách sledovaná v čase pomocí *T. versicolor*



Obr. 31 Enzymová aktivita MnP v tekutých půdách sledovaná v čase pomocí *P. magnoliae*

Ligninolytické enzymy hub bílé hniloby degradují široké spektrum organopolutantů a tato schopnost byla popsána v řadě studií [19]. Byla prokázána degradace 2,4,6-trinitotoluenu účinkem MnP pomocí *P. chrysosporium* [60]. Rovněž byla prokázána degradace PAU ligninolytickými enzymy, především pomocí *I. lacteus* MnP [61]. Ligninolytické enzymy jsou také uplatňovány při degradaci syntetických barviv, např. byla naměřena aktivita MnP produkovaná *P. chrysosporium*, *P. sordina* a *Bjerkandera sp.* BOS55 při rozkladu barviv [62]. Také je předpokládán vztah mezi biodegradací PCB a ligninolytickými enzymy [63].

Thomase a kol. (1992) [64] předpokládali, že za degradaci ligninu a PCB je zodpovědná enzymová aktivita nejen LiP, MnP, ale i Lac nebo arylalkohol oxidasy (AAO) nebo jejich kombinace. Beaudette a kol. (1998) [49] došli k závěru, že rozdílné houby bílé hniloby mají rozdílnou enzymovou specifitu vůči PCB a ve studii nepotvrdili vztah mezi biodegradační aktivitou a přítomností ligninolytických enzymů.

Při porovnání naměřených výsledků této práce s výsledky Beaudette a kol. byla pozorována shoda. V průběhu biodegradace PCB, kdy u *B. adusta* byla zaznamenána produkce MnP, u *P. chrysosporium* nebyla detekována aktivita ligninolytických enzymů a u *T. versicolor* byla detekována MnP. Ale výsledky byly rozdílné u *P. ostreatus*, kde nebyla detekována LiP a Lac aktivita jen v nízkých hodnotách [49].

Byla sledována závislost aktivity ligninolytických enzymů na podmínkách kultivace, které mohou ovlivnit syntézu a produkci ligninolytických enzymů. Například v průběhu biodegradačního experimentu pomocí *P. magnolia* na KIRK médiu byla naměřena aktivita MnP  $22,6 \pm 6,0$  U/l, zatímco v kulturách v MEG médiu nebyla detekována, viz Tab. 10. Dále u *T. versicolor* byla naměřena aktivita Lac v kultivaci na KIRK médiu  $183,0 \pm 6,7$  U/l, zatímco v kultivaci na MEG médiu pouze  $21,4 \pm 9,5$  U/l, viz Tab. 13. Z těchto výsledků vyplývá, že použité živné médium mělo vliv na produkci ligninolytických enzymů.

## 6 ZÁVĚR

Houby bílé hniloby představují perspektivní organismy z hlediska biodegradací PCB.

Přínosem této diplomové práce byla rozsáhlá charakteristika schopnosti biodegradace Deloru 103 pomocí osmi druhů ligninolytických hub ve dvou typech živných tekutých médií. Byla zjištěna významná biodegradace schopnost jednotlivých kongenerů u *P. ostreatus* v obou typech živných médií. Dále byla prokázána významná biodegradace (s výjimkou některých penta- a hexa-CB) u *B. adusta* v Malt-extrakt glukózovém médiu a u *I. lacteus* v Kirkově médiu. U ostatních studovaných ligninolytických hub byla prokázána degradace pouze nízkochlorovaných bifenyliů. Výsledky této práce ukazují, že houby bílé hniloby jsou schopny efektivně degradovat PCB v relativně krátké době.

Důležitým aspektem bylo sledování akutní toxicity v průběhu biodegradace experimentu. Bylo zjištěno, že *P. ostreatus* je vhodný pro dekontaminaci PCB, neboť v průběhu biodegradace PCB bylo pozorováno snížení akutní toxicity ve srovnání s kontrolou. Ve většině případů byl pozorován vzrůst akutní toxicity ve srovnání s kontrolou, což je nevýhodou biodegradace procesu.

Dalším důležitým aspektem bylo pozorování aktivity ligninolytických enzymů. V průběhu biodegradace experimentu v obou typech živných tekutých médií byla detekována enzymová aktivita Lac v kulturách *D. squalens*, *P. cinnabarinus* a *T. versicolor*; enzymová aktivita LiP v kulturách *P. cinnabarinus*; enzymová aktivita MnP v kulturách *B. adusta*, *I. lacteus* a *P. magnoliae* (jen v KIRK médiu) a MiP nebyla detekována. Byl studován vztah naměřených výsledků biodegradace a aktivity ligninolytických enzymů. Houba *P. ostreatus* vykazovala nejvyšší schopnost biodegradace Deloru 103 v obou typech živných médií. V průběhu kultivací byla detekována v kontaminovaných kulturách enzymová aktivita Lac, která byla v Kirkově médiu 2 krát nižší a v Malt-extrakt glukózovém médiu 25 krát nižší než v kulturách bez Deloru 103. Bylo zjištěno, že přítomnost PCB neměla významný vliv na produkci lakasy. Houba

*B. adusta* vykazovala vysokou schopnost biodegradace Deloru 103 v Malt-extrakt glukózovém médiu, kde byla detekována vysoká aktivita mangan-dependentní peroxidasy (max.  $62,0 \pm 7,1$  U/l). Ale *B. adusta* vykazovala poloviční schopnost biodegradace v Kirkově médiu, kde byla detekována také vysoká aktivita mangan-dependentní peroxidasy (max.  $52,7 \pm 3,5$  U/l). *D. squalens* vykazoval nízkou biodegradční schopnost v obou typech živných médií, ale v kulturách byly naměřeny vysoké aktivity lakasy. *P. cinnabarinus* vykazoval nízkou biodegradační aktivitu v obou typech živných médií, ale v kulturách byly naměřené vysoké aktivity lakasy a ligninperoxidasy. U houby *P. chrysosporium* byla pozorována relativně vysoká biodegradační schopnost, ačkoliv nebyly detekovány aktivity ligninolýtických enzymů. Z těchto naměřených výsledků nemůže být charakterizována přesná role ligninolýtických enzymů při odstraňování PCB.

## 7 PŘEHLED LITERATURY A POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Ministerstvo životního prostředí České republiky, stránky integrovaného registru znečišťování životního prostředí, online: <[www.irz.cz/latky/polychlorovane\\_bifen](http://www.irz.cz/latky/polychlorovane_bifen)> [cit. 1.4.2010]
- [2] VÉBER K., KREDL F.: Polychlorované bifenyly v biosféře, zejména ve vodách a některých vodních organismech. Academia, 1.vyd. Praha (1991), 72 s. ISBN 80-200-0361-4 .
- [3] BALLSCHMITER K., ZELL M., FRESENIUS J.: Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Analytical Chemistry* 302 (1980): 20 – 31.
- [4] TOTEVOVÁ S., PROUZA M., BRENNER V., DEMNEROVÁ K.: Bakteriální degradace PCB. *Chemické Listy* 91 (1997), 858 – 866.
- [5] DOUCETTE W. J., ANDREN A. W.: Solubility of polychlorinated biphenyls in binary water/organic solvent systems. *Chemosphere* 24 (1992): 1347 – 1360.
- [6] HOLOUBEK I., PETRIK J., KOHOUTEK J., VELEK K., ANSORGOVÁ A.: Polychlorované bifenyly (PCBs) a další typy halogenovaných polutantů v prostředí. In: Polutanty v ekosystému II, sborník referátů ze semináře. Čížek Z. (ed.), Praha (1996), 9 – 20.
- [7] BALLSCHMITER K., RAPPE CH., BUSECH R., KIMBROUGH R.D., JENSEN S.: Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalens, Dibenzodioxins and Related Products. *Elsevier Science Publisher B.V.* 2 (1989), 47.
- [8] KUBÁTOVÁ A.: Optimalizace a aplikace analytických metod při studiu biodegradace polychlorovaných bifenyly (PCB). *Disertační práce* (1997), Praha.
- [9] HOLOUBEK I., 2006: Národní implementační plán Stockholmské úmluvy v České republice, příloha č.3, Hodnocení pro chemické látky dle přílohy A, část II chemické látky (PCBs). online: <[www.recetox.muni.cz/sources/unido\\_NIP/Anex\\_03.pdf](http://www.recetox.muni.cz/sources/unido_NIP/Anex_03.pdf)> [cit. 1.4.2010]



- [10] DE SPEREIRA M.: Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins (PCDD), Dibenzofurans (PCDF) and Polychlorinated Biphenyls (PCB). *Environmental Behaviour and Risk to Man and Biota* 27 (2004): 934 – 943.
- [11] FRAME G. M., WAGNER R. E., CARNAHAN J. C., BROWN J. F., MAY R. J., SMULLEN L. A., BEDARD D. L.: Comprehensive, quantitative, congener-specific analysis of eight Aroclory and complete PCB congener assignments on DB-1 capillary GC columns. *Chemosphere* 33 (1996) 603 – 623.
- [12] KÁŠ J.: Biotechnologie životního prostředí. Praha (2000), 142 s. ISBN 80-7080-376-2.
- [13] HOFFMAN D. J. , RATTNER B. A., BUTON G. A., CAIRNS J.: Handbook of Ecotoxicology (2001), 424 – 439.
- [14] SKERFVING S., SVENSSON B. G., ASPLUND L., HAGMAR L.: Exposure to Mixtures and Congeners of Polychlorinated Biphenyls. *Clinical Chemistry* 40 (1994), 1409 – 1415.
- [15] Sbírka zákonů č. 384/2001. Vyhláška Ministerstva životního prostředí ze dne 17. října 2001 o nakládání s polychlorovanými bifenyly, polychlorovanými terfenyly, monometyltetrachlordifenylmetanem, monometyldichlordifenylmetanem, monometyldibromdifenylmetanem a veškerými směsmi obsahujícími kteroukoliv z těchto látek v koncentraci větší než 50 mg/kg (o nakládání s PCB). Částka 145: 8421-8436.
- [16] Článek 16. Bioremediační technologie k odstranění polychlorovaných bifenyly ze životního prostředí; R - T & A Úvodní národní inventura POPs v ČR Část VII - Technologie a biotechnologie; online: <[www.recetox.muni.cz](http://www.recetox.muni.cz)> [cit. 1.4.2010]
- [17] LUOTAMO M., JÄRVISALO J., AITIO A.: Assessment of exposure to PCBs: analysis of selected isomers in blood and adipose tissue. *Environmental Research* 54 (1994), 121 – 134.
- [18] VELÍŠEK J.: Chemie potravin. Osis, Tábor (1999), 247 – 256, ISBN 80-902391-2-9.
- [19] POINTING S. B.: Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57 (2001), 20 – 33.

- [20] KIRK T. K., FARREL R. L.: Enzymatic „combustion“: the microbial degradation of lignin. *Annul Review of Microbiology* 41 (1987), 465 – 505.
- [21] JEFFRIES T. W.: Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1 (1990), 163 – 176.
- [22] HATAKKA A.: Biodegradation of lignin. In: Biopolymers. Nakladatelství WILEY-VCH (2001), 129 – 180, ISBN 3-527-30220-4.
- [23] BALDRIAN P.: Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30 (2006), 215 – 242.
- [24] THURSTON C. F.: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Uk* 140 (1994), 19 – 26.
- [25] JOHANES C., MAJCHERCZYK A.: Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78 (2000), 193 – 199.
- [26] TIEN M., KIRK T.: Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161 (1988), 238 – 249.
- [27] WARIISHI H., GOLD M. H.: Lignin peroxidase Compound III: formation, inactivation and conversion to the native enzyme. *FEBS Letters* 243 (1989): 165 – 168.
- [28] HOFRICHTER M.: Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30 (2002): 454 – 466.
- [29] MARTINEZ M. J., RUIZ-DUENAS F. J., GUILLEN F., MARTINEZ A. T.: Purification and catalytic properties of twomanganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237 (1996), 424 – 432.
- [30] Moreira P. R., Bouillenne F., Almeida-Vara E., Malcata X., Frère J. M., Duarte J. C.: Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. Isolate. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006), 28 – 33.
- [31] ALEXANDER M.: Biodegradation and bioremediation. Academic, New York (1994), 302 s., ISBN 0-12-049860.
- [32] ALLARD A. S., NEILSON A.: Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration and Biodegradation* 39 (1997), 253 – 285.

- [33] FIELD JIM A., SIERRA-ALVAREZ R.: Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution* 155 (2008), 1 – 12.
- [34] FRANČOVÁ K., MACKOVÁ M. A MACEK T.: Vzájemné působení rostlin a bakterií při degradaci PCB. *Chemické Listy* 96 (2002), 214 s.
- [35] KAMEI I., SONOKI S., HARAGUCHI K., KONDO R.: Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Applied Microbiology Biotechnology* 73 (2006b), 932 – 940.
- [36] ABRAMOWICZ D. A.: Critical Aerobic and Anaerobic Biodegradation of PCBs. *Reviews in Biotechnology* 10 (1990), 241 – 251.
- [37] FUKURAVA K.: Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation* 5 (1994), 289 – 300.
- [38] TOTEVOVÁ S., PROUZA M., BRENNER V. A DEMNEROVÁ K.: Geny zodpovědné za syntézu enzymů metabolismu PCB. *Chemické Listy* 92 (1998), 312 – 316.
- [39] BEDARD D. L., HABERL M. L., MAY R. J., BRENNAN J.: Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (1987), 1103 – 1112.
- [40] HÄGGBLOM M. M.: Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 103 (1992), 29 – 72.
- [41] ARENSDORF J. J., FOCHT D. D.: A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobifenyl by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Mikrobiology* 61 (1995), 443 – 447.
- [42] FOCHT D. D.: Microbial degradation of chlorinated biphenyls. *Soil biochemistry* 8 (1993), 341 – 407.
- [43] FETZNER S., LINGES F.: Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiological Rewies* 58 (1994), 641 – 685.

- [44] VRÁNA B., HALUŠKA L., BALÁŽ Š., DERCOVÁ K.: Anaerobic degradation of polychlorinated biphenyls in soils. *Chemické Listy* 88 (1994), 766 – 775.
- [45] QUENSEN J. F., BOYD S. A., TIEDJE J. M.: Dechlorination of 4 commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), 2360 – 2369.
- [46] VAN DORT H. M., BEDARD D. L.: Reductive ortho and meta Dechlorination of a Polychlorinated Biphenyl Congener by Anaerobic Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), 1576 – 1578.
- [47] BUMPUS J. A., TIEN M., WRIGHT D., AUST S. D.: Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus (*Phanerochaete chrysosporium*). *Science* 228 (1985), 1434 – 1436.
- [48] YADAV J. S., QUENSEN J. F. III, TIEDJE J. M., REDDY C. A.: Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995), 2560 – 2565.
- [49] BEAUDETTE L. A., DAVIES S., FEDORAK P. M., WARD O. P., PICKARD M. A.: Comparison of Gas Chromatography and Mineralization Experiments for Measuring Loss of Selected Polychlorinated Biphenyl Congeners in Cultures of White Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998), 2020 – 2025.
- [50] KUBÁTOVÁ A., ERBANOVA P., EICHLEROVÁ I., HOMOLKA L., NERUD F., ŠAŠEK V.: PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 43 (2001), 207 – 215.
- [51] KOMOŠA D., LANGEBARTELS C., SANDERMANN JR. H.: Metabolic processes for organic chemicals in plants. In: Trapp, S., McFarlane, J.G. (Eds.), *Plant Contamination, Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA (1995), 69 – 103.

- [52] MOEDER M., CAJTHAML T., KELLER G., ERBANO VÁ P., ŠAŠEK V.: Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61 (2005), 1370 – 1378.
- [53] KAMEI I., KOGURA R., KONDO R.: Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Applied Microbiology Biotechnology* 72 (2006a), 566 – 575.
- [54] SANGELY M., SABLAYROLLES C., VIALLE C., STREHAIANO P., THANNBERGER L., MONTREJAUD-VIGNOLES M.: Polychlorinated biphenyls fractioning in aqueous bioremediation assay with *Phanerochaete chrysosporium*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 89 (2009), 849 – 856.
- [55] ČSN EN ISO 11348-2 (2000): Česká technická norma: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi.
- [56] GIROTTI S., FERRI E. N., FUMO M. G., MAIOLINI E.: Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta* 608 (2008), 12 – 29.
- [57] FLEGROVÁ Z., BARTOŠ T.: Microtox. EU-DG Research Centre of Excellence for Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Masaryk University (2005).
- [58] MATSMURA E., YAMAMOTO E., NEMATA A., KAWANO T., SHIN T., MURANO S.: Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxylbenzoic acids in the presence of ABTS (2, 2'- azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfatic acid). *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (1986), 1355 – 1357.
- [59] DE JONG E., CAZEMIER A. E., FIELD J. A., DE BONT J. A. M.: Physiological Role of Chlorinated Aryl Alcohols Biosynthesized De Novo by the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994): 271 – 277.

- [60] PASZCYNski A., CRAford R. L.: Potential for bioremediation of xenobiotic compound by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Program 11* (1995), 368 – 379.
- [61] CAJTHAML T., ERBANOVÁ P., KOLLMANN A., NOVOTNÝ Č., ŠAŠEK V., MOUGIN C.: Degradation of PAH by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica 53* (2008), 289 – 294.
- [62] MOREIRA M. T., MIELGO I., FEIJOO G., LEMA J. M.: Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnology Letters 22* (2000), 1499 – 1503.
- [63] FUJIHIRO F., HIGUCHI R., HISAMATSU S., SONOKI S.: Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Applied Microbiology and Biotechnology 82* (2009), 853 – 860.
- [64] THOMAS D. R., CARSWELL K. S., GEORGIU G.: Mineralization of biphenyl and PCBs by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering 40* (1992), 1395 – 1402.

## 8 PŘÍLOHY

Příloha A: Číslování PCB podle IUPAC

PCB	Polohy Cl	PCB	Polohy Cl	PCB	Polohy Cl	PCB	Polohy Cl
1	2	53	2,2',5,6'	105	2,3,3',4,4'	157	2,3,3',4,4',5'
2	3	54	2,2',6,6'	106	2,3,3',4,5	158	2,3,3',4,4',6
3	4	55	2,3,3',4	107	2,3,3',4',5	159	2,3,3',4,5,5'
4	2,2'	56	2,3,3',4'	108	2,3,3',4,5'	160	2,3,3',4,5,6
5	2,3	57	2,3,3',5	109	2,3,3',4,6	161	2,3,3',4,5',6
6	2,3'	58	2,3,3',5'	110	2,3,3',4',6	162	2,3,3',4',5,5'
7	2,4	59	2,3,3',6	111	2,3,3',5,5'	163	2,3,3',4',5,6
8	2,4'	60	2,3,4,4'	112	2,3,3',5,6	164	2,3,3',4',5',6
9	2,5	61	2,3,4,5	113	2,3,3',5',6	165	2,3,3',5,5',6
10	2,6	62	2,3,4,6	114	2,3,4,4',5	166	2,3,4,4',5,6
11	3,3'	63	2,3,4',5	115	2,3,4,4',6	167	2,3',4,4',5,5'
12	3,4	64	2,3,4',6	116	2,3,4,5,6	168	2,3',4,4',5',6
13	3,4'	65	2,3,5,6	117	2,3,4',5,6	169	3,3',4,4',5,5'
14	3,5	66	2,3',4,4'	118	2,3',4,4',5	170	2,2',3,3',4,4',5
15	4,4'	67	2,3',4,5	119	2,3',4,4',6	171	2,2',3,3',4,4',6
16	2,2',3	68	2,3',4,5'	120	2,3',4,5,5'	172	2,2',3,3',4,4',5'
17	2,2',4	69	2,3',4,6	121	2,3',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
18	2,2',5	70	2,3',4',5	122	2',3,3',4,5	174	2,2',3,3',4,5,6'
19	2,2',6	71	2,3',4',6	123	2,3,4,4',5	175	2,2',3,3',4,5',6
20	2,3,3'	72	2,3',5,5'	124	2',3,4,5,5'	176	2,2',3,3',4,6',6
21	2,3,4	73	2,3',5',6	125	2',3,4,5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
22	2,3,4'	74	2,4,4',5	126	3,3',4,4',5	178	2,2',3,3',4,6',6
23	2,3,5	75	2,4,4',6	127	3,3',4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
24	2,3,6	76	2',3,4,5	128	2,2',3,3',4,4'	180	2,2',3,4,4',5,5'
25	2,3',4	77	3,3',4,4'	129	2,2',3,3',4,5	181	2,2',3,4,4',5,6
26	2,3',5	78	3,3',4,5	130	2,2',3,3',4,5	182	2,2',3,4,4',5,6'
27	2,3',6	79	3,3',4,5'	131	2,2',3,3',4,6	183	2,2',3,4,4',5',6
28	2,4,4'	80	3,3',5,5'	132	2,2',3,3',4,6'	184	2,2',3,4,4',6,6'
29	2,4,5	81	3,4,4',5	133	2,2',3,3',5,5'	185	2,2',3,4,5,5',6
30	2,4,6	82	2,2',3,3',4	134	2,2',3,3',5,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
31	2,4',5	83	2,2',3,3',5	135	2,2',3,3',5,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
32	2,4',6	84	2,2',3,3',6	136	2,2',3,3',6,6'	188	2,2',3,4',5,6,6'
33	2',3,4	85	2,2',3,4,4'	137	2,2',3,4,4',5	189	2,3,3',4,4',5,5'
34	2',3,5	86	2,2',3,4,5	138	2,2',3,4,4',5'	190	2,3,3',4,4',5,6
35	3,3',4	87	2,2',3,4,5'	139	2,2',3,4,4',6	191	2,3,3',4,4',5',6
36	3,3',5	88	2,2',3,4,6	140	2,2',3,4,4',6'	192	2,3,3',4,5,5',6
37	3,4,4'	89	2,2',3,4,6'	141	2,2',3,4,5,5'	193	2,3,3',4',5,5',6
38	3,4,5	90	2,2',3,4',5	142	2,2',3,4,5,6	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
39	3,4',5	91	2,2',3,1',6	143	2,2',3,4,5,6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
40	2,2',3,3'	92	2,2',3,5,5'	144	2,2',3,4,5',6	196	2,2',3,3',4,4',5',6
41	2,2',3,4	93	2,2',3,5,6	145	2,2',3,4,6,6'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
42	2,2',3,4'	94	2,2',3,5,6'	146	2,2',3,4',5,5'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
43	2,2',3,5	95	2,2',3,5',6	147	2,2',3,4',5,6	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
44	2,2',3,5'	96	2,2',3,6,6'	148	2,2',3,4',5,6'	200	2,2',3,3',4',5',6,6'
45	2,2',3,6	97	2,2',3',4,5	149	2,2',3,4',5',6	201	2,2',3,3',4',5,5',6
46	2,2',3,6'	98	2,2',3',4,6	150	2,2',3,4',6,6'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
47	2,2',4,4'	99	2,2',4,4',5	151	2,2',3,5,5',6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
48	2,2,4,5	100	2,2',4,4',6	152	2,2',3,5,6,6'	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
49	2,2',4,5'	101	2,2',4,5,5'	153	2,2',4,4',5,5'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
50	2,2',4,6	102	2,2',4,5,6'	154	2,2',4,4',5,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'
51	2,2',4,6'	103	2,2',4,5',6	155	2,2',4,4',6,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
52	2,2',5,5'	104	2,2',4,6,6'	156	2,3,3',4,4',5	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
						209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'

